



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



Caio César Barbosa Bomfim

Avaliação do Potencial Antileucêmico de Adutos Aromáticos de Morita-Baylis-Hillman

**João Pessoa - PB
2013**

Caio César Barbosa Bomfim

**Avaliação do Potencial Antileucêmico de Adutos Aromáticos de
Morita-Baylis-Hillman**

**Monografia apresentada ao curso de
Farmácia do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal da Paraíba, como
parte integrante dos pré-requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Farmácia**

Orientador: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

João Pessoa – PB

2013

Caio César Barbosa Bomfim

**Avaliação do Potencial Antileucêmico de Adutos Aromáticos de
Morita-Baylis-Hillman**

**Monografia apresentada ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, como parte integrante dos pré-requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Farmácia. A citação de qualquer trecho deste
trabalho é permitida, desde que seja feita com as normas da ética científica.**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo (Orientador)

Prof. Dr. Mário Luiz Araujo de Almeida Vasconcellos (membro)

Profa. Me^a. Gláucia Veríssimo Faheina Martins (membro)

Dr. Alethéia Lacerda da Silveira (suplente)

Aos meus pais, Elcio e Cícera

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as bênçãos que tem me propiciado.

Aos meus pais, por todo ensinamento e dedicação. O motivo real de cada vitória minha conquistada são eles, que sempre acreditaram em mim e se empenharam nas minhas lutas.

Às minhas irmãs Vanessa, Letícia e Larissa, por todo carinho e por tornarem meus dias mais alegre e divertido.

Aos tios Carlos Freire e Lúcia Barbosa, que contribuíram bastante para essa conquista. E aos tios Pedro Barbosa e Helena Barbosa pelas conversas e conselhos, eu aprendi muito com eles também.

Aos primos Carminha, Mariinha, José Carlos e Magna e aos seus respectivos cônjuges Isaías, Jocy, Francilândia e Amarildo, por todo apoio. E também aos primos Júnior, Lorrana, Lorruma, Lomaira pela amizade e parceria.

Aos meus velhos e bons amigos Salatiel, Ivo e Saulo, pelo companheirismo e inúmeras aventuras.

Ao meu orientador, Demetrius Araújo, pela orientação desse trabalho, pelo apoio, amizade e por colaborar imensamente com meu amadurecimento profissional.

Aos meus companheiros de laboratório, do grupo de citotoxicidade: Hervé, Fany, meu “chará” Caio César, Pricila e as minhas “co-coorientadoras” Gláucia Faheina e Alethéia Lacerda, pela convivência diária, amizade, e por vários momentos agradáveis que passamos juntos.

À Bruna Dantas, também uma companheira de laboratório, amiga pra todos os tempos, que me deu forças pra eu continuar seguindo esse caminho da pesquisa científica, que é árduo, mas que ela me ensinou a ver de uma forma mais suave e até mesmo divertida.

Aos demais componentes dos grupos de eletrofisiologia e biologia molecular: Itácio, Laís, T. Cris, Juan, Clidevam, Katiane, André, Rafael, Vanessa e Alyne, pela amizade e vários momentos compartilhados nas nossas discussões de seminários, que tanto acrescentou em meu crescimento.

À Paulo Victor, também pertencente ao grupo acima, pela amizade ímpar e parceria, pelos momentos de distração e diversão no meio dessa correria e tensão de final de curso, pelas corridas na praia e pelas partidas de vôlei. Formamos uma dupla imbatível.

À minha “família pessoense”, a qual morei junto por um bom tempo: Débora Janyne (prima), Laíza Dourado, Ramon Tavares e Rominho. Imagino que deve ter sido árduo me aturarem por tanto tempo. Também aprendi muito com cada um deles.

Ao meu grande amigo, Júlio César Queiroz, que considero um irmão que ganhei nesta cidade. Minha dupla das aulas práticas desde o início do curso, foram várias noites fazendo trabalhos e estudando até a madrugada, muitos “aperreios” passamos juntos, mas conseguimos. Muito obrigado.

À todos os meus colegas de turma 2008.1: Alysson Santiago, Amanda Pedrosa, Anderson Moura, Andressa Lira, Ayala Nara, Bruna Caldas, Daniella Galdêncio, Danilo Macêdo, Demóstenes Figueiredo, Fernanda Nóbrega, Iara Leão, Lindemberg Damasceno, Luciana Ramalho, Mayara Cabral, Mayza Neves, Paulo César, Pricila Ramos, Pricilla Maciel, Rômulo Pereira, Tarliane Pedrosa. Foi muito bom conviver com todos vocês durante esses cinco anos, muitas alegrias, tristezas, preocupações, estresses, em fim, muitas emoções, mas valeu apenas cada momento que vivi com vocês.

*“A mente que se abre a uma nova
idéia, jamais retorna ao seu
tamanho original”.*

(Albert Einstein)

RESUMO

As leucemias compreendem uma grande variedade de doenças hematológicas malignas que podem ser classificadas como: aguda ou crônica, que por sua vez, podem acometer diferentes tipos celulares, distinguindo-se em mielóide e linfóide. Os fármacos antileucêmicos constituem uma importante ferramenta no tratamento desta patologia, entretanto, apesar de todo arsenal terapêutico disponível, existem problemas na seletividade e toxicidade que limitam seu uso. Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar a citotoxicidade de uma classe de substâncias, adutos de Morita-Baylis-Hillman, utilizando cultura de células leucêmicas (HL-60, K562, K562-Lucena e MOLT-4) e células normais (PBMC) avaliando o seu efeito por meio de técnicas como a Redução do MTT e captação do vermelho neutro; além de propor um possível mecanismo de morte celular usando os testes de coloração diferencial por laranja de acridina e brometo de etídeo (LA/BE) em microscópio de fluorescência, análise do ciclo celular e análise do potencial transmembrânico mitocondrial em citometria de fluxo. Dentre as substâncias avaliadas, o composto A2CN apresentou maior potência frente à linhagem HL-60 ($CI_{50} = 22 \mu M$) e MOLT-4 ($21 \mu M$) do que em PBMC ($71 \mu M$) com 24 horas de incubação avaliadas pelo MTT. Nas linhagens mais resistentes K562 ($58 \mu M$) e K562-Lucena ($60 \mu M$), também pode ser observado seu efeito citotóxico. Nos estudos de morte celular, o A2CN induziu o aumento de células apoptóticas avaliadas por microscopia de fluorescência, além de induzir a fragmentação do DNA e a despolarização da membrana mitocondrial, ambas avaliadas por citometria de fluxo. Diante o exposto, pode-se concluir que a substância A2CN induziu apoptose em células leucêmicas possivelmente pela ativação da via intrínseca, apresentando maior seletividade para linhagem leucêmica do que para as células não tumorais.

Palavras chave: adutos de Morita-Baylis-Hillman, apoptose, citotoxicidade, leucemia.

ABSTRACT

Leukemia includes a variety of hematological carcinogenic diseases, affecting various cell types at different stages of cellular maturation. This pathology can be classified in four classes: acute and chronic, which are divided into lymphoid and myeloid. Anti-leukemic drugs have been important tools in the treatment of this disease; however these substances have been displayed problems, showed a low selectivity and high toxicity, which have limited their use in the clinical treatment. Therefore, aim of this study was to investigate the cytotoxicity of some substances classified as Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA), using the culture of some leukemic cells, HL-60, K562, K562-Lucena and MOLT-4, as well as normal cells from peripheral blood mononuclear cell (PBMC). The effect of these MBHA synthetic molecules were evaluated by MTT reduction and neutral red uptake techniques and the mechanism of cell death was studied using differential staining tests with acridine orange and ethidium bromide (LA/BE) probes, being observed under fluorescence microscope. The cell cycle and mitochondrial transmembrane potential analyzes were measured using the flow cytometry technique. Using the MTT assay, the compound A2CN showed greater potency against the strain HL-60 ($IC_{50} = 22 \mu M$) and MOLT-4 ($21 \mu M$) than in PBMC ($71 \mu M$) after 24 hours of incubation. In the resistant K562 cells, the A2CN showed an IC_{50} of $58 \mu M$, and for K562-Lucena cells the IC_{50} was $60 \mu M$. In studies of cell death, the A2CN induced an increase of apoptotic cells assessed by fluorescence microscopy. In addition A2CN induced DNA fragmentation and depolarization of the mitochondrial membrane; both results were assessed by flow cytometry. It was concluded that the substance A2CN induced apoptosis in leukemia cells with higher selectivity for leukemic lineage than for the non-tumor cells.

Keywords: apoptosis, cytotoxicity, leukemia, Morita-Baylis-Hillman adducts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Origem e maturação das células sanguíneas.	19
Figura 2: Formação do cromossomo Philadelphia.	22
Figura 3: Função da Pgp.	25
Figura 4: Etapas hierárquicas do processo de descoberta/invenção de novo composto protótipo de fármacos.....	28
Figura 5: Reação descrita por Baylis-Hillman.	29
Figura 6: Mecanismo proposto por Hoffman/Hill para a RMBH.	30
Figura 7: Vias de morte celular.	34
Figura 8: Vias de ativação da apoptose.....	36
Figura 9: Representação das estruturas químicas dos AMBH.	42
Figura 10: Células coradas com Brometo de etídeo e laranja de acridina.	48
Figura 11: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens MOLT-4 (A, C, E) e HL-60 (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 24 horas.....	56
Figura 12: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens K562 (A, C, E) e K562 Lucena (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 24 horas.....	57
Figura 13: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens HL-60 (A, C, E) e MOLT-4 (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 72 horas.....	58
Figura 14: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens HL-60 (A, C, E) e MOLT-4 (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 72 horas.....	59

Figura 15: Atividade citotóxica dos compostos A2CN em HL-60 determinada pelo ensaio do CVN num período de incubação de 24 horas.	60
Figura 16: Atividade citotóxica dos compostos A2CN em PBMC determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 24 horas.	61
Figura 17: Efeito do A2CN na linhagem HL-60 analisado pela coloração diferencial com brometo de etídeo/laranja de acridina, após 24 horas de tratamento.	62
Figura 18: Análise da variação do potencial transmembrânico da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo em células HL-60, com 24 horas de incubação.	64
Figura 19: Efeitos no ciclo celular e no conteúdo de DNA da linhagem HL-60 avaliadas por citometria de fluxo.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2012 do número de casos novos por câncer.	18
Tabela 2: Atividade citotóxica de AMBH na linhagem HL-60 num período de 24 horas de incubação determinado pelo ensaio do MTT.	54
Tabela 3: Avaliação citotóxica dos isômeros na linhagem HL-60 e em PBMC com 24 horas de incubação e índice de seletividade.	61

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AMBH	Adutos de Morita – Baylis - Hillman
ANOVA	Análise de variância
BCR-ABL	Proteína oncogênica tirosina-quinase
BE	Brometo de etídeo
CCCP	Carbonil cianeto m-clorofenildrazona
CI₅₀	Concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo
CO₂	Dióxido de carbono
CVN	Captação do Vermelho Neutro
DABCO	1,4-diazabiccliclo [2.2.2] octano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
GEA	Grupos elétron-atratores
INCA	Instituto Nacional do Câncer
HEPES	Ácido N-2-hidroximetilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HL-60	Linhagem de células de leucemia mielóide aguda
K-562	Linhagem de células de leucemia mielóide crônica
LA	Laranja de acridina
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
MOLT-4	Linhagem de células de leucemia linfóide aguda
MS	Ministério da saúde
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salina
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano
PHA	Fitohemaglutinina
Ph	Cromossomo Philadelphia
RMBH	Reação de Morita-Baylis-Hillman
rpm	Rotações por minuto
RPMI 164	Meio e cultura para células

SAR	Relação estrutura atividade
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER	17
1.2 LEUCEMIAS	18
1.2.1 Leucemia Mieloide Aguda	20
1.2.2 Leucemia Mieloide Crônica	21
1.2.3 Leucemia Linfóide Aguda	23
1.2.4 Leucemia Linfóide Crônica	24
1.3 FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS	24
1.4 QUÍMICA FARMACÊUTICA	26
1.5 ADUTOS DE MORITA BAYLLIS HILLMAN	28
1.6 CITOTOXICIDADE	31
1.7 MORTE CELULAR	32
1.5 VIAS DE ATIVAÇÃO DA APOPTOSE	35
2 OBJETIVOS	38
2.1 GERAL	38
2.2 ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS	40
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	40
3.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	41
3.3.1 Substância teste	41
3.3.2 Cultivo celular	43
3.3.3 Obtenção de PBMC	44
3.3.4 Ensaio de redução do MTT	45
3.3.5 Captação do Vermelho Neutro	46

3.3.6 Avaliação do padrão de morte celular: coloração diferencial por BE/LA	47
3.3.7 Análise do potencial mitocondrial com tetrametilrodamina	49
3.3.8 Análise do ciclo celular	50
3.3.9 Análise de dados	51
4 RESULTADOS	53
4.1 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS AMBH	53
4.2 COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR BE/LA	62
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL.....	63
4.4 ESTUDO DO CICLO CELULAR E DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA.....	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	74
7 REFERÊNCIAS	76

Introdução

INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (MS/INCA, 2012). Muitos cânceres são originados de uma única célula que sofreu uma mutação somática, mas a progênie desta célula necessita de muitas outras mutações adicionais, antes que elas se tornem um câncer (ALBERTS et al. 2010). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas (MS/INCA, 2012).

A tumorigênese é um processo composto por múltiplos passos, que refletem alterações genéticas oriundos tanto da ativação de proto-oncogenes em oncogenes, os quais controlam os processos de crescimento, divisão e sobrevivência celular, quanto de mutações que levam à perda da função e/ou inativação dos genes supressores tumorais, relacionados com o controle do crescimento celular desregulado e a ativação de vias de reparo do DNA (ácido desoxirribonucleico). Mecanismos epigenéticos também contribuem para a alteração da expressão destes genes (LEE e MULLER, 2010; SANTARIUS et al., 2010).

Mais apuradamente, o câncer é descrito como sendo o produto do mau funcionamento da regulação do ciclo celular cujas células mutadas e injuriadas – normalmente destinadas a morrer - são permitidas a progredir realizando o ciclo celular, acumulando mutações (FOSTER, 2008).

O câncer pode ser causado por uma das três vias, sendo elas: dieta incorreta, predisposição genética e pelo meio ambiente. Pelo menos 35% de todos os cânceres são causados por dieta incorreta, e, no caso do câncer de cólon, a dieta pode responder por 80% dos casos. A predisposição genética proporciona 20% de casos de câncer, levando a maioria dos cânceres a serem associados à carcinogênese ambiental (REDDY et al., 2003).

Dados publicados pelo Ministério da Saúde/Instituto Nacional do Câncer mostram que o tipo mais incidente é o câncer de pele não melanoma, seguido por próstata e pulmão para o sexo masculino, e mama e colo do útero para o sexo feminino. As estimativas para o ano de 2012, que também serão válidas para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2012 do número de casos novos por câncer.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novo	
	Homens	Mulheres
Próstata	60.180	-
Mama Feminina	-	52.680
Colo do Útero	-	17.540
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	10.110
Cólon e Reto	14.180	15.960
Estômago	12.670	7.420
Cavidade Oral	9.990	4.180
Laringe	6.110	-
Bexiga	6.210	2.690
Esôfago	7.770	2.650
Ovário	-	6.190
Linfoma não Hodgkin	5.190	4.450
Glândula Tireoide	-	10.590
Sistema Nervoso Central	4.820	4.450
Leucemias	4.570	3.940
Corpo do Útero	-	4.520
Pele Melanoma	3.170	3.060
Outras Localizações	43.120	38.720
Subtotal	195.190	189.150
Pele não Melanoma	62.680	71.490
Todas as Neoplasias	257.870	260.640

Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>

É possível visualizar na tabela que as leucemias ocupam o décimo quinto lugar em incidência no Brasil, totalizando 8.510 novos casos. Um número considerável que requer mais atenção no sentido de conhecer essa doença e desenvolver novas alternativas terapêuticas.

1.2 LEUCEMIAS

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfoides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (SWERDLOW et al., 2008).

Essas neoplasias surgem em um dos tipos de glóbulos brancos. Podem surgir nos linfoblastos, que são células linfoides no estágio inicial de desenvolvimento, resultando em uma doença de início rápido, denominada leucemia linfóide aguda (LLA). Quando a neoplasia envolve células maduras, é denominada leucemia linfocítica crônica (LLC) e geralmente é mais indolente. A leucemia também pode ser de origem granulocítica, ocorrendo tanto em células jovens mieloblásticas, resultando na leucemia mieloide aguda (LMA), quanto em granulócitos maduros, resultando em leucemia mieloide crônica (LMC). Também existem variedades mais raras, incluindo as monocíticas (WHO, 2009). A figura 1 mostra a escala de maturação das células hematopoiéticas.

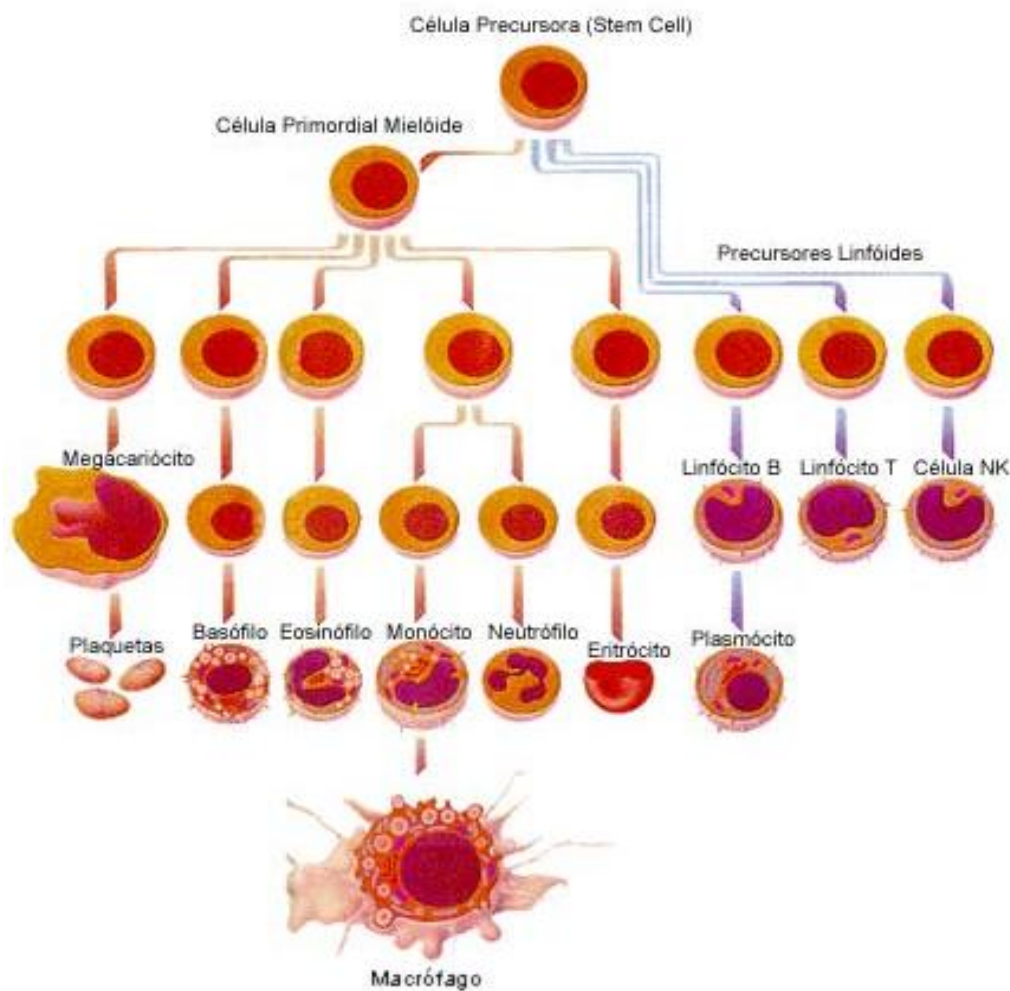


Figura 1: Origem e maturação das células sanguíneas.

Disponível em : http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344

GILLILAND e colaboradores (2004) reportaram que a leucemia, assim como outros cânceres, pode resultar da ocorrência de múltiplas etapas, nas quais mutações de múltiplos genes acontecem nas células precursoras do espaço medular. O primeiro evento (mutação)

leva a uma hematopoiese clonal. Nesta etapa, são muito comuns alterações clonais, sendo tais anormalidades usualmente associadas à perda de genes supressores de tumor. Porém, esta única mutação não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia, sendo necessária a aquisição de anormalidades cariotípicas nas células da medula óssea. Neste último estágio, é evidenciado o bloqueio da diferenciação (parada maturativa), um aumento da população blástica na medula e a leucemia propriamente dita.

Acredita-se que os diversos genótipos das células neoplásicas representam a manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular que coletivamente ditam a proliferação maligna. Esses fatores são: I) autossuficiência dos sinais de crescimento; II) insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento; III) evasão da morte celular programada (apoptose); IV) potencial de replicação ilimitado; V) angiogênese sustentada; e VI) invasão de tecidos e metástase (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

Como geralmente não se conhece a causa exata da leucemia, o tratamento tem o objetivo de destruir as células leucêmicas, para que a medula óssea possa ser repopulada por células saudáveis. Portanto, em geral se usa a combinação de poliquimioterapia, controle das complicações infecciosas e hemorrágicas, prevenção ou combate da doença no sistema nervoso central e, em alguns casos, é indicado o transplante de medula óssea (INCA, 2012).

1.2.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

A LMA é uma neoplasia caracterizada por um acúmulo excessivo de precursores mieloides na medula óssea que perderam a capacidade de se diferenciar normalmente e de responder a reguladores normais de proliferação. O evento leucemogênico pode ocorrer em uma célula-tronco comprometida com a linhagem mieloide, impedindo a maturação e a diferenciação das células. À medida que estas células imaturas se acumulam na medula óssea, elas substituem as células mielocíticas, megacariocíticas e eritrocíticas normais, levando a uma perda da função da medula óssea.

Em decorrência da não funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos com diagnóstico de LMA frequentemente apresentam sintomas como: fadiga, astenia e palidez, em virtude da anemia; sangramento gengival e outras manifestações hemorrágicas, resultantes da plaquetopenia; e febre, devido a complicações infecciosas associadas à neutropenia ou à liberação de citocinas secretadas pelas células leucêmicas (BAIN, 2003; BASSAN et al., 2004; GUIMARÃES, 2004). Nesses pacientes, pode-se observar linfadenopatia generalizada,

esplenomegalia e hepatomegalia, devido à infiltração das células leucêmicas nos diferentes tecidos do organismo (PEJOVIC e SCHWARTZ, 2002).

A LMA é mundialmente reportada em cerca de 4 casos a cada 100 mil habitantes, correspondendo a aproximadamente 20 % dos casos totais de leucemias na população em geral (HEAD, 2004). Na população adulta, é a mais comum neoplasia mieloide com uma média de idade de 70 anos, isso corresponde à cerca de 80% dos casos de leucemias agudas em adultos. Porém, na infância, a LMA é um tipo raro, correspondendo a cerca de 15% - 20% das leucemias agudas que atingem crianças até os 18 anos de idade. Por outro lado, em recém-nascidos, a LMA corresponde a aproximadamente 49% dos casos (LICHTMAN & LIESVELD, 2001).

A linhagem celular HL-60 é um modelo *in vitro* bastante utilizado nos estudos farmacológicos da LMA.

1.2.2 Leucemia Mieloide Crônica (LMC)

A incidência mundial de leucemia mieloide crônica (LMC) é geralmente de 1.0–1.5/100.000 população/ano, podendo aumentar em países onde a idade média da população está aumentando, já que a incidência de LMC aumenta com a idade (GOLDMAN, 2008). O sexo masculino é frequentemente mais acometido que o feminino, e as mulheres parecem apresentar uma vantagem no tempo de sobrevida (BERGUER et al., 2005).

A LMC é principalmente caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) ou translocação t (9:22), que une o protooncogene C-ABL presente no cromossomo 9 à região BCR do cromossomo 22 (Fig. 2). O gene de fusão formado, BCR-ABL, provoca uma expressão desregulada da atividade tirosina quinase da ABL (PACHECO et al., 2009).

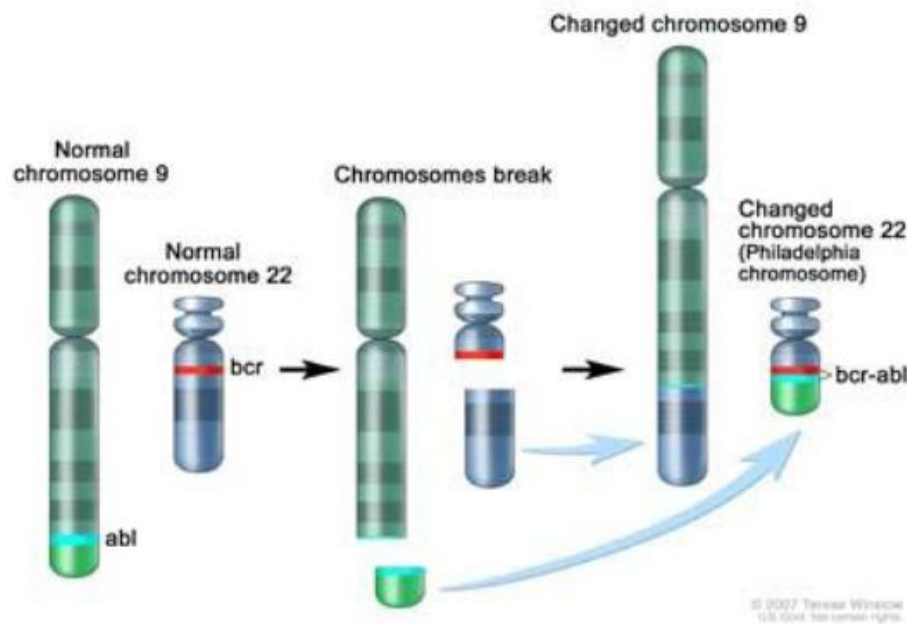


Figura 2: Formação do cromossomo Philadelphia. Esse cromossomo é derivado da troca de parte do cromossomo 22 com um segmento do cromossomo 9. O gene quimérico no cromossomo 9 é irrelevante para a LMC.

Disponível em: www.health.com/.../0,,ncicdr0000258006,00.html

Esta oncoproteína interage com vias de sinalização que levam a célula ao crescimento e ativam programas antiapoptóticos que prolongam a sobrevivência celular na ausência de fatores de crescimento (CLARK et al., 2002). É capaz de ativar NFκB, Ras e Rac, PI3 kinase e induzir expressão de c-Myc e Bcl-2 (GOLDMAN, 2008). A ativação de vários desses mecanismos pelo BCR/ABL é necessária para a transformação das células hematopoiéticas pelo oncogene (Fig. 2) (SOKAL et al., 2002) e a progressão da doença é resultado de aquisições espontâneas de uma série de mudanças moleculares que são acompanhadas de novas mudanças citogenéticas (GOLDMAN, 2008). K562 é uma linhagem de leucemia mieloide crônica, que expressa a proteína BCR/ABL, rotineiramente utilizada para os estudos *in vitro* dessa doença.

A LMC pode evoluir em duas ou três fases. Inicialmente há uma fase lenta, chamada de fase crônica, na qual ocorre uma expansão clonal maciça de células mieloides que continuam mantendo a capacidade de diferenciação e que são bem controladas com terapias convencionais. Cerca de 90% dos pacientes são diagnosticados nessa fase (QUINTAS-CARDAMA e CORTES, 2006). Entretanto, com o avanço do tempo, a doença progride e entra em um estágio intermediário, a fase acelerada, que leva entre 1 e 1,5 anos. Em seguida, este clone perde a capacidade de diferenciação e a doença passa invariavelmente para uma

leucemia aguda denominada de crise blástica, com fenótipo agressivo, altamente resistente a quimioterápicos e que leva a morte do paciente em no máximo 6 meses. Em muitos casos, o estágio intermediário não é observado (CORTEZ et al, 1996; KANTARJIAN et al; 1993).

1.2.3 Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

A LLA é o tipo mais comum de leucemia da infância, sendo estimado, aproximadamente, de 30 a 50 novos casos por milhões de crianças, e representa de 25% a 30% de todas as malignidades infantis, com um pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade, afetando mais frequentemente pacientes do sexo masculino (KABRIAEIE et al, 2003).

A LLA é uma desordem maligna de células progenitoras linfóides caracterizada pelo acúmulo clonal de linfócitos imaturos na medula óssea. O clone, que sofre a transformação, pode ser originado de células pluripotentes ou de células progenitoras mais maduras, sendo as aberrações ocorridas nos mecanismos de proliferação e diferenciação dessas células capazes de comprometer a hematopoiese (LIGHTFOOT, 2005; KEBRIAEI et al., 2003).

A etiologia da LLA permanece desconhecida, embora sejam enfatizados como possíveis causas: efeitos da irradiação, exposição a fármacos antineoplásicos, doenças genéticas hereditárias (como Síndrome de Down, ataxia-teleangiectasia e anemia de Fanconi), fatores imunológicos e exposições a alguns vírus. Uma hipótese que tem sido bastante pesquisada é a de que ocorra mutação genética, ainda no período intra-útero, e que exista um segundo evento após o nascimento, tal como infecção, por exemplo, capaz de desencadear a doença (GREAVES, 1999; WIEMELS et al., 1999). Normalmente são encontradas várias alterações genéticas nas células leucêmicas e não somente uma. Estudos utilizando amostras de sangue coletadas para o teste do pezinho, de crianças que apresentaram leucemia, evidenciaram a presença das alterações cromossômicas já ao nascimento, o que favorece a hipótese da origem pré-natal da LLA (WIEMELS et al., 1999; TAUB et al., 2002; BURJANIVOVA et al., 2006).

Com os atuais protocolos de tratamento, cerca de 95% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) alcançam remissão, definida por microscopia óptica como menos de 5% de blastos na medula óssea. Infelizmente cerca de 25% destes pacientes ainda apresentarão recaída (SZCZEPANSKI, 2007), na maioria das vezes por um clone idêntico ou relacionado àquele presente no diagnóstico (ZHOU, 2007).

1.2.4 Leucemia Linfóide Crônica (LLC)

A LLC compreende o tipo mais comum de leucemia que acomete adultos no mundo ocidental. Aproximadamente 180 mil novos casos são registrados mundialmente por ano (GINALDI et al., 1998; HALLEK et al., 2008).

A causa exata da LLC ainda é desconhecida e de acordo com estudos epidemiológicos não existe associação clara com infecções virais, exposição química ou radiação. Entretanto, sabe-se que ela está relacionada com a idade avançada (GOLDIN e SLAGER, 2007).

Até recentemente acreditava-se que a LLC poderia ter origem tanto da linhagem B quanto T, contudo avanços no estudo do fenótipo e das alterações moleculares melhoraram o conhecimento sobre o sistema imune e sobre as neoplasias linfóides e permitiram uma melhor caracterização destas patologias. Diversas síndromes linfoproliferativas T foram identificadas e hoje são consideradas entidades clínico-patológicas distintas que fazem parte do diagnóstico diferencial da LLC. O termo LLC designa uma síndrome linfoproliferativa específica do linfócito B (HAMBLIN, 2000).

Os portadores da LLC muitas vezes exibem hipogamaglobulinemia severa e alteração na troca de classes das imunoglobulinas (Ig). Como consequência destas disfunções os pacientes apresentam aumento na susceptibilidade a infecções bacterianas, o que contribui para a maior morbidade e a mortalidade desta doença (DEARDEN, 2008; HAMBLIN e HAMBLIN, 2008).

1.3 FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

Um dos maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia no tratamento de alguns tipos de neoplasias é o desenvolvimento, por parte das células tumorais, do fenômeno de resistência aos fármacos utilizados, não havendo resposta ao tratamento (LONGLEY et al., 2005). Esta resistência à quimioterapia é responsável pelo insucesso no tratamento.

São reconhecidos dois tipos de resistência: a intrínseca, quando não há resposta mesmo no primeiro ciclo do tratamento, e a adquirida, quando surge no segundo ciclo (pós-terapia) (HILL, 1996; MITSCHER, et al., 1999). A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um caso de resistência adquirida, observada em células tumorais, *in vivo* e *in vitro*, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos, tanto àquele que foi utilizado inicialmente, quanto a outros empregados como alternativa. Uma das características mais

intrigantes da MDR é que os quimioterápicos envolvidos não têm analogia estrutural nem farmacológica (DEWICK, 2009).

Um dos genes humano responsável pela resistência a múltiplas drogas (MDR1 ou ABCB1) codifica uma proteína integral de membrana, glicoproteína P (Pgp), que depende de energia para seu funcionamento, exportando substâncias do interior das células ou das membranas para o meio extracelular (FROMM et al., 2002).

A Pgp humana é uma proteína transmembrana de 170 KDa fosforilada e glicosilada, com 1280 aminoácidos, composta de duas seqüências homólogas e simétricas, cada qual contendo seis domínios transmembrana e uma região de ligação ao ATP. Como a Pgp é uma bomba de efluxo, ela é capaz de mover fármacos do domínio intracelular para o extracelular e também interagir com moléculas presas à bicamada lipídica da membrana celular (MARZOLINI et al., 2004) (Fig. 3).

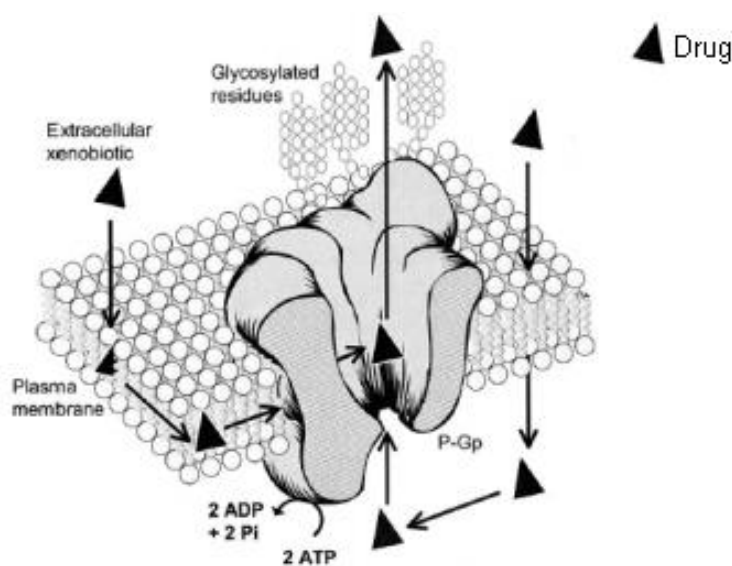


Figura 3. Função da Pgp. Esse modelo mostra o transporte de fármacos mediado por Pgp que pode ocorrer em nível de membrana plasmática ou do compartimento intracelular.

Fonte: Marzolini et al., 2004.

Embora tenha sido inicialmente detectada em células tumorais, a Pgp é também expressa em células de tecidos normais, como por exemplo, as do trato gastrointestinal, em hepatócitos e nas células epiteliais dos túbulos proximais nos rins (THÖRN et al., 2005; LESLIE et al., 2005). A atividade da Pgp no fígado e nos rins estaria relacionada à eliminação de drogas (KUSUHARA et al, 1998), enquanto no intestino, reduziria a absorção das mesmas (WATKINS et al., 1997), além de possivelmente prevenir o acúmulo de bactérias e seus produtos (LESLIE et al., 2005).

Muitos quimioterápicos com alvos intracelulares utilizados no tratamento do câncer, principalmente os da classe dos alcaloides da vinca, epipodofilotoxinas, taxóis e antraciclinas são substratos da Pgp/ABCB1 (GOLDSTEIN, 1996). Como este vasto espectro de drogas contra o câncer é transportado pela Pgp/ABCB1, e devido à existência de tumores resistentes a múltiplas drogas na clínica, uma das estratégias adotadas para superar o fenótipo MDR tem sido o uso de agentes moduladores, que atuam de modo competitivo ou não nos sítios de ligação dos quimioterápicos. Exemplos destes agentes são a ciclosporina A, verapamil e valspodar. No entanto, o uso clínico destes tem sido limitado devido aos vários efeitos colaterais e pelo fato de nem sempre reverterem o fenótipo MDR in vivo (FLETCHER et al., 2008; LEE, 2010). Alguns produtos naturais têm demonstrado uma boa atividade inibitória sobre os transportadores envolvidos no fenótipo MDR, como a quercetina, curcumina e quinina (MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2008).

1.4 QUÍMICA FARMACÊUTICA

Desde os primórdios da humanidade, o homem busca na natureza recursos para aliviar a dor e tratar as doenças que o acomete. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos nossos ancestrais concentravam-se nos recursos advindos da natureza (plantas, animais e minerais) (BARBERATO FILHO, 2006).

Apenas no final do século XIX, estimulada pela busca para encontrar medicamentos menos tóxicos do que aqueles baseados em fontes naturais, iniciou-se a pesquisa e desenvolvimento de substâncias sintéticas para fins terapêuticos, sendo o seu uso amplamente disseminado no século XX (THOMAS, 2007). Paul Erlich, pesquisador alemão, Prêmio Nobel de Medicina em 1908 (1854-1915), tornou-se grande marco na indústria farmacêutica por realizar a primeira síntese metódica e intencional de compostos químicos para combater a sífilis (PALMEIRA FILHO e PAN, 2003).

De maneira geral, os fármacos disponíveis na terapêutica moderna são, em sua ampla maioria, de origem sintética (ca. 85%). Se considerarmos ainda aqueles oriundos de processos de hemisíntese, como muitos antibióticos obtidos a partir de intermediários homoquirais, preparados em processos fermentativos, este percentual pode superar os 85% mencionados. (BARREIRO, 2008).

A atividade biológica apresentada pelos fármacos está diretamente relacionada com a sua estrutura química. Por isso, uma das mais importantes contribuições na área da Química

Farmacêutica é a relação entre a estrutura química e a atividade biológica (SAR) apresentada pela substância (WERMUTH et al, 1998).

O estudo de uma classe de compostos previamente sintetizados e avaliados biologicamente podem trazer informações acerca do papel que grupos ou partes das moléculas desempenham na atividade biológica (farmacofórico). Estas informações podem ser utilizadas para desenvolver uma nova droga que possua maior atividade, sendo esta selecionada a partir de uma substância cuja estrutura possua melhor atividade farmacológica e com menores efeitos colaterais indesejáveis (THOMAS, 2003).

Atualmente, diversas estratégias de planejamento racional ou desenho molecular de novos fármacos são disponíveis, sendo a que se baseia no mecanismo de ação farmacológica, também chamada de abordagem fisiológica, a principal (MUSSER, 1996; GANELLIN, 2000).

A escolha da estratégia de planejamento estrutural a ser adotada para o desenho molecular do ligante, a partir de uma abordagem fisiológica, dependerá do nível de conhecimento estrutural do alvo terapêutico eleito. Quando a estrutura tridimensional do alvo eleito é conhecida (aquela do sítio de reconhecimento molecular), o planejamento molecular do ligante seletivo pode ser realizado pela química computacional. Por meio dela, será identificado e sintetizado o padrão estrutural. Este padrão será avaliado, então, por meio de bioensaio *in vitro* que, se obtido sucesso, fornecerá um ligante do biorreceptor, eleito como alvo terapêutico (BARREIRO e FRAGA, 2005). A figura 4 ilustra as etapas envolvidas no processo de descoberta de um novo fármaco a partir de uma abordagem fisiológica.

Alternativamente, quando a estrutura do alvo terapêutico eleito não é conhecida, o planejamento molecular do protótipo pode ser conduzido a partir da estrutura química de seu substrato natural, inspirando novos análogos ativos, empregando-se estratégias de planejamento estrutural (BARREIRO, 2009).

Este método de obter novos fármacos, também chamado manipulação molecular ou processo seletivo, é o mais usado e, até agora, o mais compensador. Diversas estratégias são conhecidas para se introduzir modificações estruturais em um composto-protótipo, objetivando sua otimização, seja farmacocinética ou farmacodinâmica (BARREIRO, 2008). As principais estratégias que se destacam nesse momento são o bioisosterismo, a simplificação molecular e a hibridação molecular (BARREIRO, 2009).

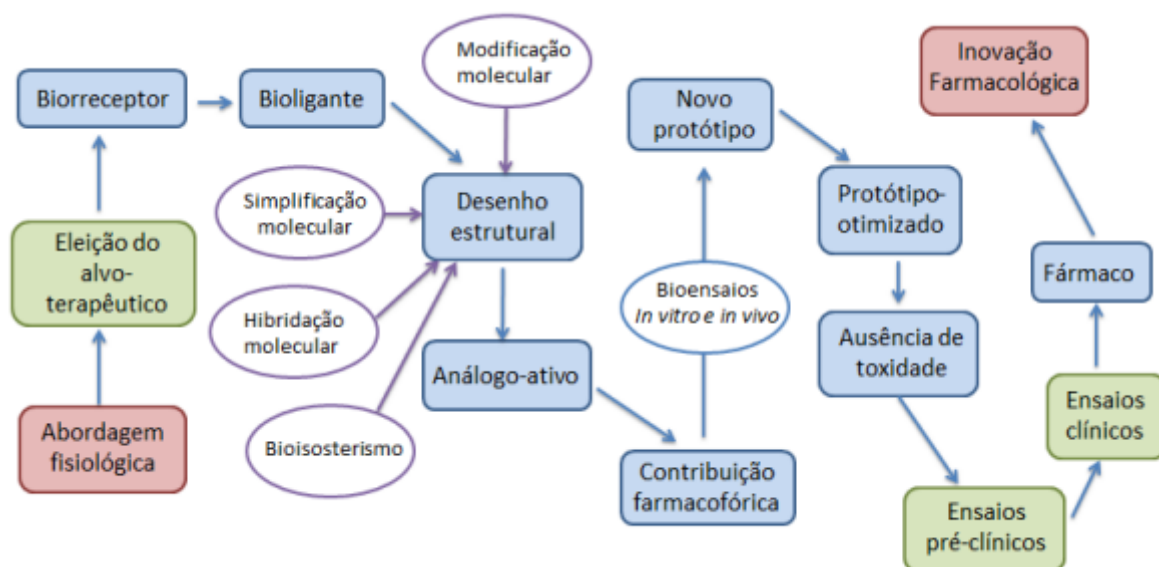


Figura 4: Etapas hierárquicas do processo de descoberta de novo composto protótipo de fármaco.

Fonte: Adaptado de BAREIRO, 2009.

Pode-se observar que o planejamento racional de fármacos envolve várias etapas, desde a escolha da doença até a comercialização da droga. O planejamento dos potenciais protótipos envolve o estudo das relações entre a estrutura e a atividade biológica e demonstra ser uma etapa relevante para o sucesso do processo de descoberta de novos fármacos (JÚNIOR, 2009).

Ao atingir este estágio do processo da descoberta planejada de novos fármacos, tem-se uma entidade molecular, o que é significativamente relevante para a elaboração de pedidos de proteção intelectual desta descoberta (BARREIRO, 2009).

1.5 ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

O estudo científico de plantas medicinais tem resultado em algumas alternativas terapêuticas, mas a pequena quantidade do extrato a partir de plantas e/ou a alta complexidade dessas estruturas, tornam a produção desses fármacos naturais muitas vezes impraticáveis, tanto pela extração natural como pela síntese química. Dessa forma, a descoberta e identificação de substâncias relativamente simples que possam ser preparadas através de poucas etapas e com uma boa produtividade se apresenta como uma alternativa eficiente capaz de contornar essa problemática (JÚNIOR et al., 2010). Dentro desse contexto está a reação de MORITA-BAYLIS-HILLMAN (RMBH).

A RMBH é um importante caminho para formação da ligação C-C (carbono-carbono) (SILVA et al., 2011). A sua origem data de 1972 por uma patente de A. B. Baylis e M. E. D.

Hillman (BAYLIS E HILLMAN, 1997). Como representada na figura 5, esta reação ocorre entre um carbono sp^2 eletrofílico (ex: aldeídos, cetonas ou iminas), e a posição α de um alceno (ou alcino) conectados por um grupo elétron-atrator (GEA), na presença de aminas terciárias como catalisadores nucleofílicos, como por exemplo o 1,4 – diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO), tendo como produto os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) (JÚNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

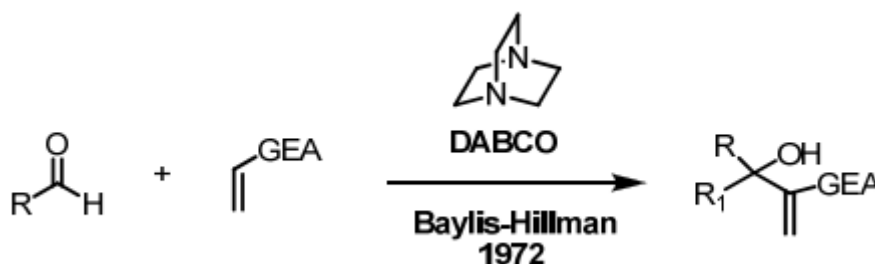


Figura 5: Reação descrita por Baylis-Hillman em 1972.

Entre as vantagens desta reação podemos destacar a completa economia de átomos, já que todos os átomos de reagente são incorporados no produto; a possibilidade de execução experimental em meio aquoso ou na ausência de solvente e a geração de produtos multifuncionalizados com grande potencial sintético (LENARDÃO et al., 2003).

O primeiro mecanismo proposto para a RMBH foi publicado por Hoffman e Rabe em 1983, modificada por Hill e Isaacs sete anos mais tarde. Nesta proposição a primeira etapa consiste numa adição de Michael de um catalisador (amina terciária **1**) a um alceno ativado **2** gerando o enolato zwitterionico **3** (Fig. 6). A etapa seguinte é uma reação de adição entre um aldeído **4** e o composto intermediário **3** formando um novo composto intermediário **5**, a qual foi proposta como etapa lenta. O próximo passo envolve uma transferência de próton intramolecular de **5** formando **6**, que por sua vez dará origem ao composto final **7** após a remoção do catalisador dando início a um novo ciclo (JÚNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

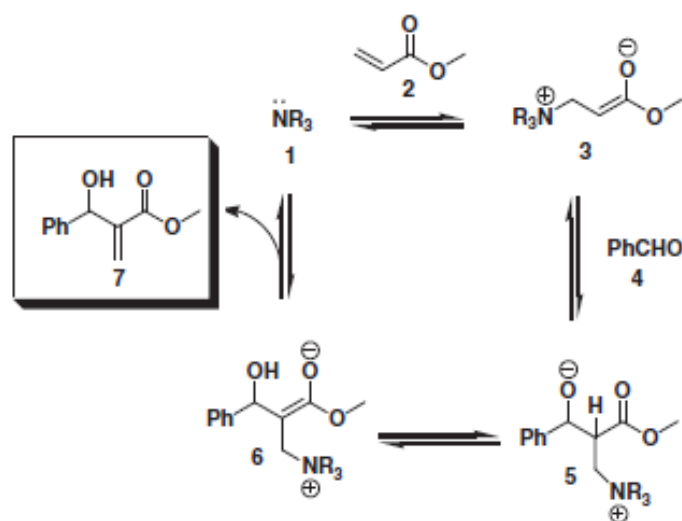


Figura 6: Mecanismo proposto por Hoffman/Hill para a reação de Morita Baylis Hillman. Adaptado de JÚNIOR e VASCONCELLOS, 2012.

Estudos anteriores revelaram que adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) possuem uma variedade de aplicações, incluindo atividade biológica. Os primeiros relatos aplicados à atividade biológica foram registrados em 1999 por Kundu e colaboradores, que realizaram a bioavaliação de alguns AMBH contra *Plasmodium falciparum*, o principal parasita causador da malária. Em 2005, Narender e colabores apresentaram mais 6 AMBH com atividade antimalarial.

Vasconcellos e colaboradores (2006) apresentaram resultados da avaliação de dez AMBH contra *Biomphalaria glabrata*. Este molusco é o hospedeiro intermediário da esquistossomose. Neste trabalho foi revelado que o grupamento nitro ligado diretamente ao anel aromática aumentou significativamente a atividade moluscida, bem como a presença do grupamento nitrila nos compostos.

Neste mesmo ano, Kohn e colaboradores descreveram a atividade antineoplásica de alguns AMBH. Neste trabalho foi observado que os adutos aromáticos foram mais ativos do que os alifáticos.

Em 2007, De Souza e colaboradores descreveram pela primeira vez a atividade antileishmania *in vitro* de 16 AMBH contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Estes adutos apresentaram alta atividade leishmanicida e baixa toxicidade quando comparada com o fármaco de referência Pentostam®.

Barbosa e colaboradores (2009) demonstraram que sete AMBH possuem forte atividade contra a forma promastigota de *L. chagasi*, a principal espécie causadora de leishmaniose visceral no Brasil.

Sandes e colaboradores apresentaram um estudo em 2010 que revelava a bioatividade do aduto 3-hidroxi-2-metileno-3-(4-nitrofenil) propanonitrila contra as formas epimastigota e tripomastigota do *Trypanosome cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas.

Em 2012, Leite e colaboradores também revelaram o potencial antimitótico de seis AMBH em células embrionárias de ouriço do mar. Este modelo biológico é uma ferramenta escolhida nos estudos de divisão celular devido a similaridade que existe no ciclo celular e nos mecanismos moleculares de controle com as células humanas.

1.6 CITOTOXICIDADE

A toxicidade consiste em uma ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo (MINE, 2003). Os estudos toxicológicos podem ser aplicados a diversos grupos alvo. De acordo com o objetivo do trabalho, pode-se avaliar a atividade da substância tóxica em vários níveis que vão desde o ambiental até o celular e genômico (WHITEHEAD et al., 2004).

Antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos, são efetuados ensaios de toxicidade extensos em sistemas *in vitro* e *in vivo* em diversas espécies de animais. Essas técnicas de bioensaio vão avaliar e definir a concentração de uma substância que seja capaz de produzir uma resposta biológica. Um dos tipos de medida de toxicidade é a DL₅₀ (dose letal para 50% do grupo de animais). Outro tipo de avaliação de toxicidade é a CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo), cuja substância é adicionada *in vitro*, em um amplo espectro de concentrações que forneça uma faixa de inibição de 0 a 100%. Assim, a ligação das substâncias aos seus receptores em células e tecidos pode ser medida diretamente e exposta como uma curva concentração-resposta (RANG et al., 2007).

Diversos métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomoléculas, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes são denominados testes de citotoxicidade, que consiste em colocar um composto direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando se há alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO, 2000).

Vários parâmetros que avaliam alvos diferentes podem ser analisados nos ensaios de citotoxicidade. Os mais frequentemente utilizados são: inibição da proliferação celular, redução da função metabólica, danos à membrana celular, danos a organelas e alterações morfológicas. Esses parâmetros foram estabelecidos ao longo de vários anos de pesquisa e em

muitos tipos celulares, destacando-se como os métodos mais utilizados o ensaio de redução do MTT e a captação do Vermelho Neutro (MELO, et al., 2003; EISENBRAND et al., 2002; BORENFREUND et al., 1998; KIM et al., 2009; SCHRÖTEROVÁ et al., 2009).

A utilização de modelos celulares como fonte primária de dados sobre o potencial toxicológico de futuros fármacos têm diversas vantagens. A redução do uso de animais em estudos de toxicidade aguda e crônica *in vivo*, a ausência de interferências de variações sistêmicas, como homeostase normal e estresse experimental, e a simulação de sistemas teciduais das interações celulares *in vitro* são algumas destas vantagens. Além disso, a cultura pode ser adaptada para determinar efeitos de curto e longo prazo, além de propiciar condições laboratoriais específicas, podendo ser reproduzível de forma rápida, relativamente econômica e sem limitações éticas (FRESHNEY, 2001; ZUCCO et al., 2004, MAY et al., 2009).

Os sistemas celulares mais empregados na toxicologia *in vitro* incluem: culturas primárias, linhagens imortalizadas, células geneticamente modificadas, células tronco, células em diferentes estágios de diferenciação, coculturas de diferentes tipos celulares, culturas tridimensionais, fatias de tecido e sistemas de barreira (ZUCCO et al., 2004).

Os estudos citotóxicos permitem avaliar a capacidade de uma substância provocar a morte celular, bem como o mecanismo e morte celular desencadeado, para assim iniciar os estudos *in vivo*, com substâncias que apresentem uma atividade promissora.

1.7 MORTE CELULAR

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. No desenvolvimento embrionário, por exemplo, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos (MEIER et al., 2000).

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência, (OKADA et al., 2004; DIMRI, 2005; CASTEDO et al., 2004). Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese (RICCI et al., 2006). A figura 7 mostra algumas vias de morte celular e suas principais características.

Autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Ela ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de

componentes celulares (DANIAL et al., 2004; LUM et al., 2005). Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos, que irão se fundir com os lisossomos. A seguir, o conteúdo dos autofagossomos será degradado pelas hidrolases lisossômicas (KELEKAR, 2005).

A mitose catastrófica envolve uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea. Geralmente, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a morte (WEAVER et al., 2005).

A senescência é um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais. As células que entram em senescência perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares (MOOI et al., 2006).

A necrose é um tipo de morte celular na qual as células sofrem um insulto que resulta na depleção energética, perda da função homeostática de canais e bombas de íons, vacuolização do citoplasma, aumento do volume celular e perda da integridade da membrana (KRISKO et al., 2008). Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (ZIEGLER et al., 2004). É considerada uma resposta passiva à injúria celular, entretanto estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG et al., 2006).

Apoptose é um fenômeno de morte celular programada, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos por KERR, WYLLIE e DURRIE (1972), que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células. Ela também é bem caracterizada na citotoxicidade de fármacos anticâncer (KIM et al., 2002; MADDIKA et al., 2007). Trata-se de um processo conservado durante a evolução, cuja desregulação interrompe o delicado balanço entre proliferação e morte celular, levando ao desenvolvimento de patologias (PLATI et al., 2011). Por exemplo, o excesso de apoptose gera doenças neurodegenerativas e imunodeficiência, enquanto a diminuição é relacionada ao desenvolvimento e progressão do câncer (COTTER, 2009; FESIK, 2005).

Várias mudanças morfológicas ocorrem durante o processo apoptótico. Uma das primeiras alterações consiste na redução do volume celular, seguindo-se a marginalização e condensação da cromatina (GALLUZZI et al., 2007). As organelas também se condensam, permanecendo intactas, embora, em alguns casos, haja a ruptura da membrana externa da mitocôndria. O núcleo se desintegra em fragmentos contidos pela membrana nuclear, os quais

possuem um padrão característico, sempre com múltiplos de 180 - 200 pares de base (WIDLAK e GARRARD, 2009). Na membrana celular surgem protuberâncias (*blebs*), as quais aumentam e se rompem originando os corpos apoptóticos, que consistem em porções celulares envolvidas pela membrana citoplasmática contendo as organelas empacotadas com ou sem fragmentos nucleares. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados pelos macrófagos teciduais ou por células do parênquima, que os digerem sem gerar qualquer reação inflamatória (TAYLOR et al., 2008).

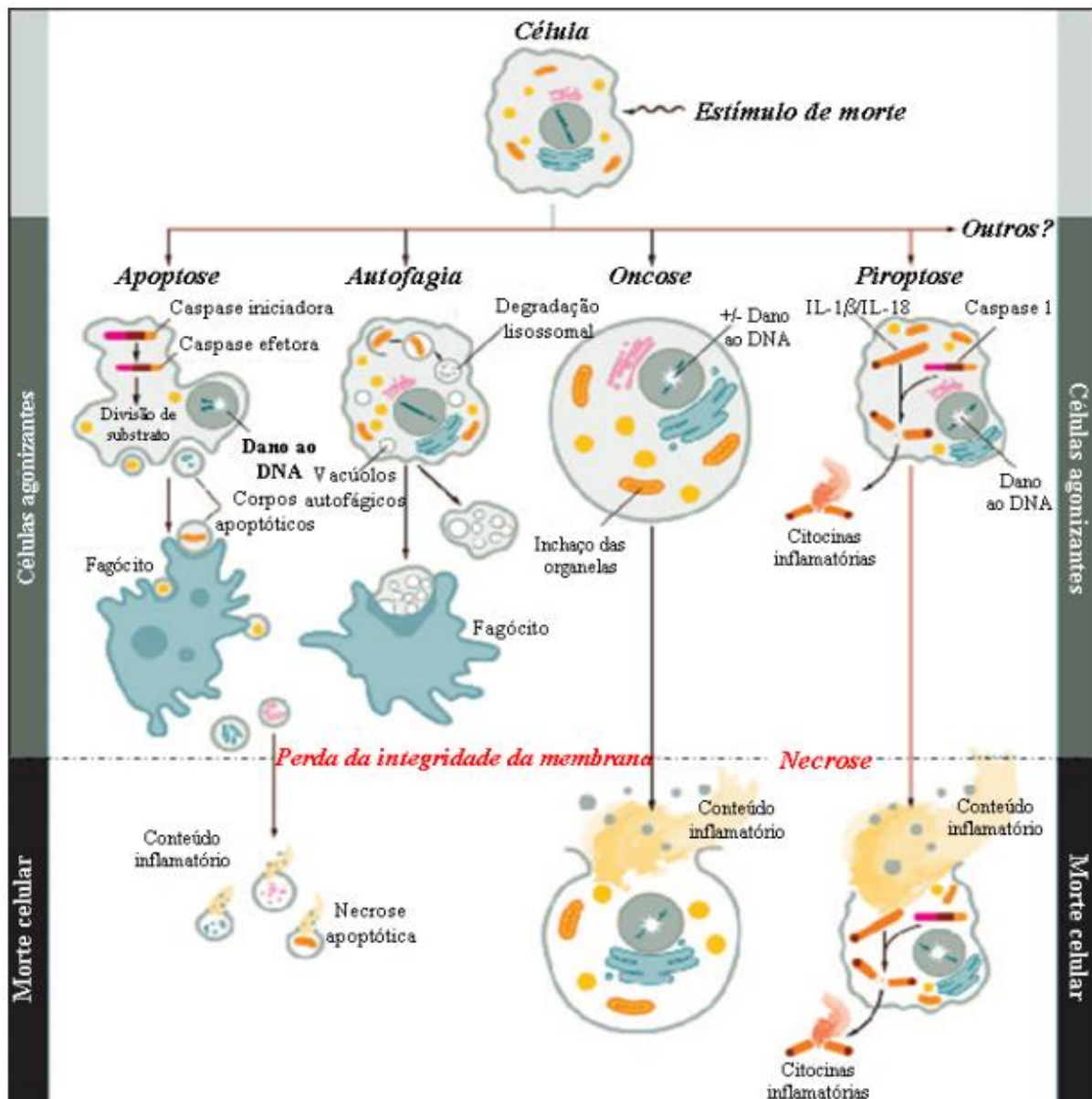


Figura 7: Vias de morte celular. As células saudáveis respondem aos estímulos de que conduzem ao desencadeamento de eventos críticos alcançando o resultado final apropriado ao estímulo recebido. Em destaque as mortes celulares por apoptose, autofagia, oncose (necrose) e piroptose.

Fonte: Adaptado de FINK e COOKSON (2005).

1.8 VIAS DE ATIVAÇÃO DA APOPTOSE

Dentre os eventos bioquímicos mais frequentemente observados durante a apoptose, estão: ativação de caspases, permeabilização das membranas mitocondriais com vazamento de diversas moléculas, ativação de fosfatidilserina e promoção da interligação de proteínas (*crosslinking*) (PELLEGRINE et al.; 2008).

Evidências atuais sugerem que há várias rotas distintas para a ativação de caspases, dependendo do estímulo que desencadeia a maquinaria de morte (SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999; SLEE et al., 1999; HENGARTNER, 2000), sendo que, em geral, duas vias distintas podem estar envolvidas: a extrínseca (também conhecida como via receptor de morte) e a intrínseca (BREDESEN, 2007), como mostra a figura 8. A apoptose iniciada via receptores de morte, tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1 e TNF-R1 (receptor fator de necrose tumoral), requerem pró-caspase-8 ou -10 no complexo. Quando esses receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas podem recrutar então a caspase-8 que, por sua vez, poderá ativar o Bid, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, convertendo-a para a forma clivada e ativa (tBid), desencadeando o processo de homo-oligomerização e translocação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bak e Bax), para a mitocôndria, ativando a via intrínseca (LI et al. 1998; JIANG et al., 2004; BAETU et al., 2002).

Entretanto, estímulos apoptóticos induzidos por agentes quimioterapêuticos em várias linhagens de leucemia parecem ser independentes desta via (EISCHEN et al., 1997; DEBATIN, 2000). Neste caso, a via intrínseca, conhecida como via mitocondrial, está envolvida (GUPTA et al., 2003).

A mitocôndria é uma organela semiautônoma que realiza funções essenciais no metabolismo celular, na produção de ATP e na morte celular (GLOVER et al., 2007; KROEMER et al., 1997). A via mitocondrial é regulada pela superfamília de proteínas Bcl-2, que consiste de três subfamílias: membros antiapoptóticos (Bcl-2 e Bcl-XL), que são localizadas na membrana externa mitocondrial, mantendo a integridade da membrana; um segundo grupo, Bid e Bim, que agem como sentinelas de processos celulares e organelas, e que quando ativos podem estimular um terceiro grupo de grandes membros apoptóticos, Bax, Bak e Bok, que localizam-se no citosol (KRISKI et al., 2002; HIGUCHI, 2007).

Essa via produz vários sinais intracelulares que causam alterações no interior da mitocôndria e resultam na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial

(MTP), despolarização do potencial transmembrânico mitocondrial e liberação de duas proteínas pró-apoptóticas, citocromo *c* e Smac/DIABLO (SAELENs et al., 2004; GARRIDO et al., 2006; ELMORE, 2007).

Após ser liberado da mitocôndria, o citocromo *C* se liga a Apaf-1 para formar o apoptossoma. A Apaf-1 oligomeriza-se e torna-se ativa, clivando e ativando, consequentemente, a pró-caspase 9. Esta então cliva e ativa as caspases efetoras (3, 6 e 7). A Smac/DIABLO, por sua vez, promove a apoptose por inibição das IAPs (proteínas inibidoras da apoptose) (ALENZI et al., 2010; BURZ et al., 2009; OLA et al., 2011).

Mais recentemente, foi descrita a participação, na via mitocondrial, de uma flavoproteína conhecida por Fator Indutor de Apoptose (AIF). A AIF migra da mitocôndria para o núcleo após um estímulo de apoptose e induz a condensação da cromatina e a clivagem do DNA em fragmentos de 200 pares de base (fragmentação internucleossomal), independente da ativação das caspases (KIM et al., 2007).

Diante do supracitado, este trabalho foi motivado por não haver ainda um fármaco que seja eficaz no tratamento das leucemias sem apresentar efeitos colaterais importantes.

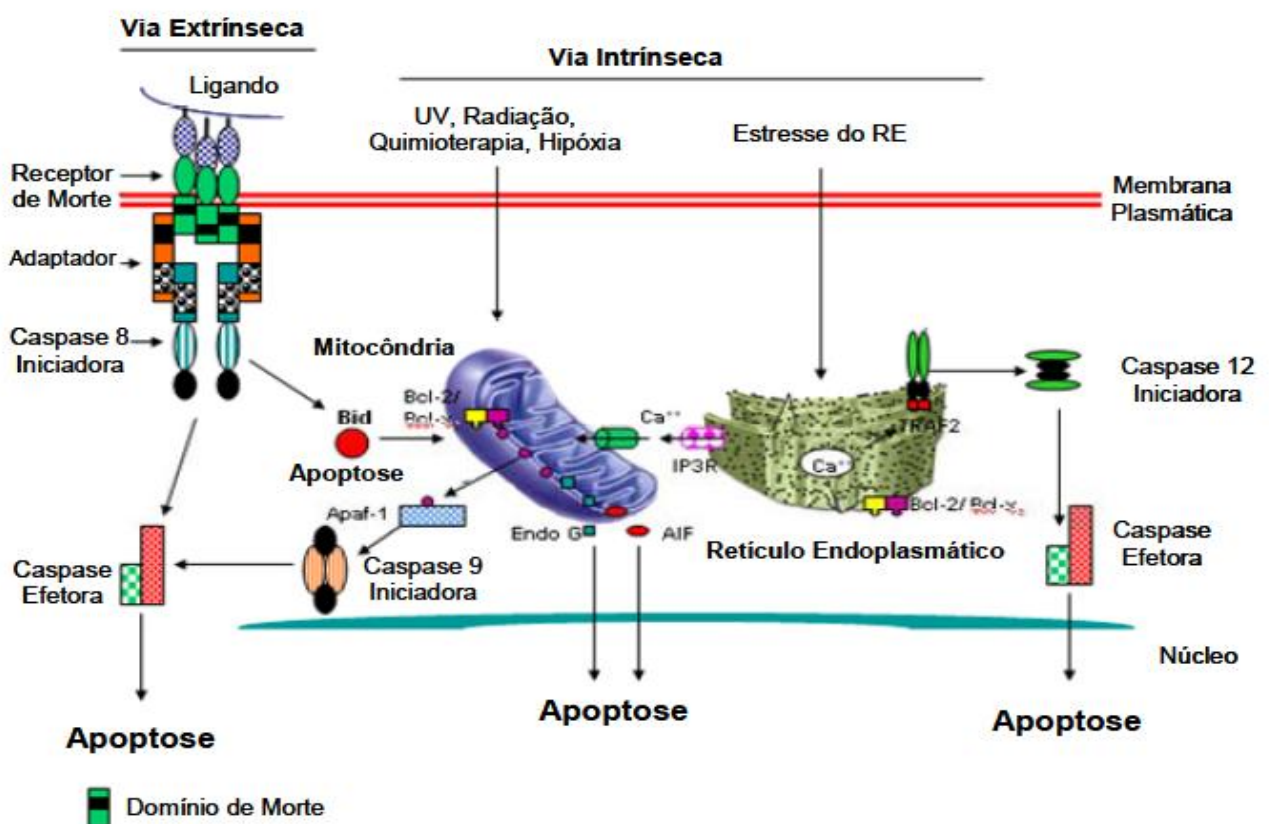


Figura 8: vias de ativação da apoptose e suas interconexões.

Fonte: Gupta, et al., 2003.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Determinar o potencial citotóxico das substâncias sintéticas aromáticas, adutos de Morita-Baylis-Hillman, em linhagens tumorais e normais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de trinta adutos de Morita-Baylis-Hillman em cultura de células leucêmicas (HL-60, MOLT-4, K562 e K562-LUCENA);
- Comparar a citotoxicidade dos compostos mais potentes em células tumorais com células normais;
- Determinar o tipo de morte celular induzido pelo composto de maior potência citotóxica.
- Avaliar o efeito no Ciclo Celular;
- Avaliar o efeito da substância sobre o potencial de membrana mitocondrial;

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

- Balão volumétrico
- Béquer
- Câmara de Neubauer
- Erlenmeyer
- Frascos estéreis para cultivo celular (25 cm²)
- Frascos para armazenamento de soluções (250, 500 e 1000 mL)
- Placas de petri
- Placas estéreis com 24 e 96 poços para cultivo celular
- Pipetas Pasteur estéreis
- Ponteiras
- Provetas
- Microtubos (1,5 e 2 mL)
- Tubos tipo falcon (15 e 50ml)

3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Agitador de placa Certomat[®] MO
- Agitador magnético TE-088 TECNAL
- Autoclave, FABBE modelo 103
- Balança analítica MODELO FA2104N, CELTAC
- Banho Maria com agitação, NOVA ÉTICA
- Centrífuga refrigerada MPW Méd Instrumens
- Citômetro de fluxo BD FASC CALIBUR (EUA)
- Estufa de secagem, FABBE
- Estufa de CO₂ HF 212 UV
- Fluxo laminar PACHANE
- Freezer - 20 °C FE26, ELECTROLUX (Suécia)
- Freezer - 80 °C ULT390-3-D31 REVCO
- Incubadora de células modelo MCO-15A, SANYO (Japão)
- Leitora de ELISA ELx800, BIOTEK (EUA)

- Microscópio óptico de inversão Hund Wetzlar modelo 6330
- Microscópio óptico de inversão XS201, TAIMIN
- Microscópio de fluorescência OLYMPUS (Japão)
- pHmetro W3B
- Refrigerador, Electrolux (Suécia)
- Vortex KMC-1300V VISION

3.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.3.1 Substância Teste

Foram utilizadas substâncias sintéticas aromáticas obtidas por RMBH, para realização do screening farmacológico. Todas as substâncias foram sintetizadas e fornecidas pelo professor Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, professor de química do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba e pesquisador responsável do Laboratório de Síntese Química Medicinal.

Para execução dos ensaios, os AMBH foram previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) puro e estéril no preparo da solução estoque de 20 mM, e diluídos seriadamente em meio (RPMI) para obtenção das concentrações finais. Os AMBH que apresentaram melhor atividade foram escolhidos para dar continuidade aos estudos.

A figura 9 mostra a estrutura química das trinta moléculas utilizadas nos testes de citotoxicidade.

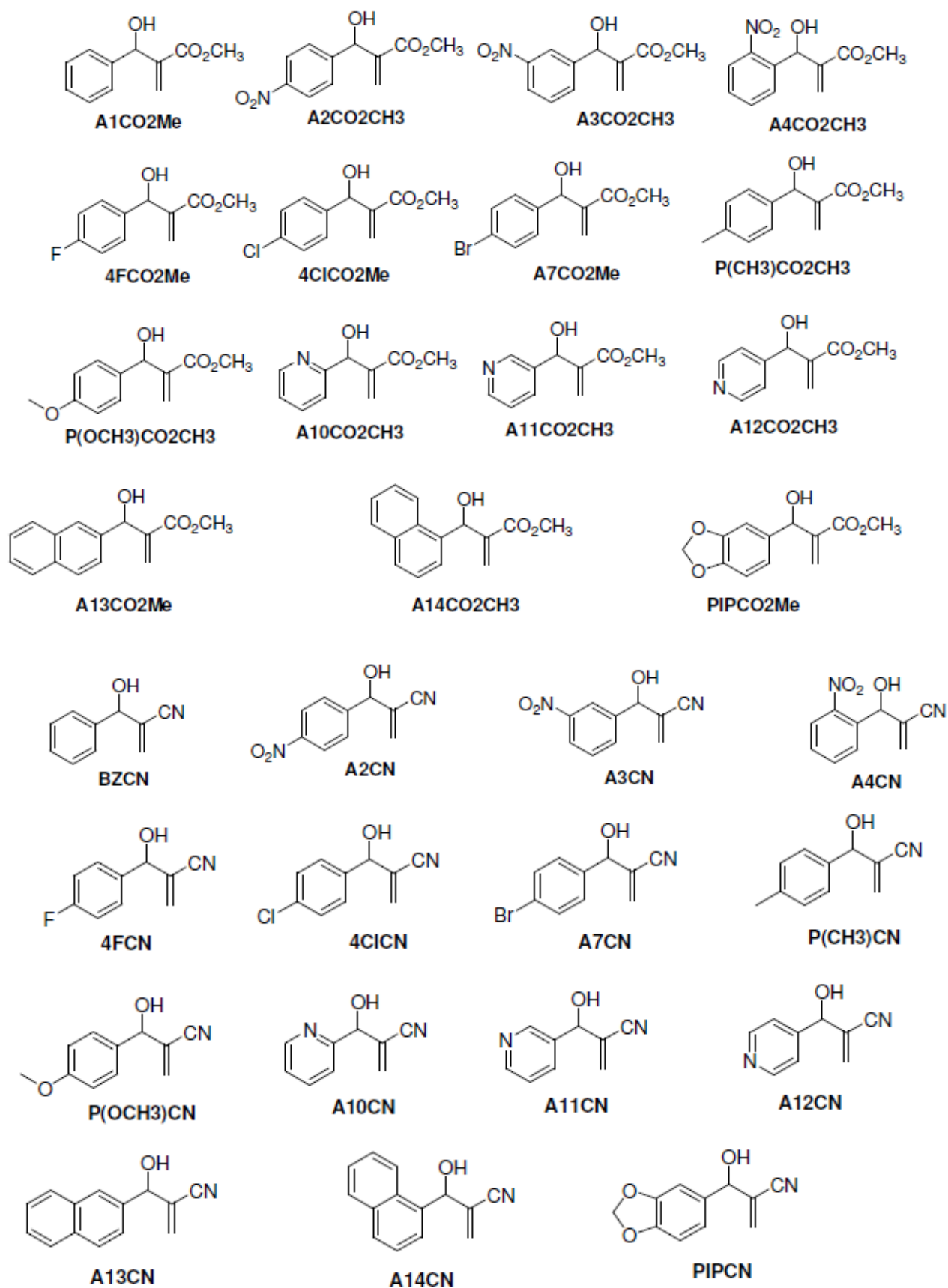


Figura 9: Representação das estruturas químicas dos AMBH utilizados nos testes de citotoxicidade.

3.3.2 Cultivo Celular

As células da linhagem HL-60 (leucemia mieloide aguda humana) e MOLT-4 (leucemia linfóide aguda humana) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, e as células K562 (leucemia mieloide crônica humana) e K562-Lucena (leucemia mieloide crônica humana com resistência a múltiplas drogas) foram doadas gentilmente pela professora Dra. Raquel C. Maia, do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Todas foram cultivadas em frascos para cultivo celular (volume de 50 mL) com o meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Essas foram mantidas na incubadora, a uma temperatura de 37 °C e atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, sendo o crescimento celular avaliado diariamente com um microscópio óptico de inversão. Quando as células atingiam 90% de confluência realizava-se uma subcultura.

Para evitar contaminações, todos os procedimentos envolvendo a manipulação de células foram realizados numa capela de fluxo laminar. Antes da execução dos experimentos, a viabilidade celular foi mensurada pelo teste de exclusão do azul tripan, que devido sua capacidade de penetrar e corar apenas as células de membrana lisada, permite quantificar a porcentagem de células vivas e mortas.

3.3.3 Obtenção De Células Mononucleares Do Sangue Periférico Humano (PBMC)

O PBMC foi isolado a partir de amostras de sangue, cedidas pelo Hemocentro da Paraíba, de doadores saudáveis, não-fumante que não tenham tomado qualquer medicamento por pelo menos 15 dias antes da amostragem e com idade entre 18-30 anos. Convém mencionar que as amostras que foram fornecidas, seriam descartadas pelo Hemocentro/PB.

Esse estudo foi realizado com base na resolução n° 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética de pesquisa com seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW, n° protocolo 655/10, folha de rosto n° 378119.

Para a obtenção do PBMC foi usado uma alíquota de 3 mL de sangue e homogeneizado com 3 mL de meio RPMI sem suplemento, em tubos estéreis, seguido da adição de 4,5 mL de Ficoll-Histopaque (GE Health care, Brasil). Realizou-se a centrifugação de 400 x g a ~ 20 °C por 30 min sendo o plasma descartado cuidadosamente. O anel de células PBMC foi retirado e adicionado em um tubo do tipo falcon, realizando-se duas lavagens com 12 mL de meio RPMI incompleto, seguido de centrifugação a 400 x g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado agitado no vórtex com 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal. Posteriormente, as células foram avaliadas quanto a sua viabilidade seguindo-se então para os experimentos, quando a viabilidade obtida foi igual ou superior a 90% (FAHEINA-MARTINS, 2009).

3.3.4 Ensaio De Redução do MTT

A redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) é um ensaio colorimétrico utilizado para avaliar a citotoxicidade de muitos compostos (KIM et al., 2009). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais (LIU et al., 1997). Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com os seus subprodutos, NADH e NADPH (LIU et al., 1997). Os cristais de formazan podem ser então dissolvidos e quantificados espectrofotometricamente (FREIMOSER et al., 1999). O valor da absorbância desse composto guarda uma proporção com o número de células viáveis (SERRANO et al., 2004).

Metodologia experimental

As células foram semeadas na concentração de 5×10^5 células/mL em placas com 96 poços, utilizando-se meio RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). O meio RPMI não continha vermelho de fenol. As células foram tratadas com concentrações crescentes dos AMBH, sendo as placas mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C por períodos que variaram entre 24 e 72 horas. Após o tempo de incubação, retirou-se 110 µL do sobrenadante e colocou-se 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich, EUA). Após 4 horas, acrescentou-se 100 µL de uma solução de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,01% de ácido clorídrico (HCl) para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da placa foi feita com 12 hs, a 570 nm, em leitor tipo ELISA (Biotek Instruments EL800, EUA) (SILVEIRA, 2007).

3.3.5 Captação Do Vermelho Neutro (CVN)

Ao nível subcelular, o sistema lisossomal tem sido identificado como um alvo dos efeitos tóxicos de certas substâncias (SVENDSEN et al., 2004). A técnica de CVN baseia-se no uso do vermelho neutro, um fraco corante catiônico que se liga por ligações hidrofóbicas eletrostáticas em sítios aniônicos e/ou grupos fosfato na matriz lisossomal das células vivas (MELO, et al., 2000; THORNTON et al., 1995). A exposição a um agente tóxico que altere a superfície celular ou a membrana lisossomal diminui a retenção desse corante em seu interior (RENZI et al., 1993). A quantidade de vermelho neutro, retida no lisossomo, é então determinada espectrofotometricamente. Este ensaio tem sido extensivamente utilizado, por ser simples, sensível e econômico (MELO, et al., 2003).

Metodologia experimental

As células foram semeadas em placas com 96 poços na concentração de 5×10^5 células/mL, utilizando-se meio RPMI sem vermelho de fenol, e tratadas com concentrações crescentes do A2CN. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C por 24 horas. Após esse período, retirou-se 100 µL do sobrenadante e colocou-se 100 µL de vermelho neutro (50 g/mL, Sigma Aldrich, EUA), previamente incubado por 12 horas e filtrado em membrana esterilizante. Após 4 horas, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com solução salina PBS - Dulbeccopara eliminar o excesso de corante extracelular. Em seguida foi acrescentada a solução de lise (1% ácido acético e 49% etanol absoluto), com a finalidade de extrair o vermelho neutro incorporado nos lisossomos. A placa foi agitada por 30 minutos e a absorbância foi mensurada a 540 nm, em leitor tipo ELISA (Biotek Instruments EL800, EUA) (SILVEIRA, 2007).

3.3.6 Avaliação do Padrão de Morte Celular: Coloração Diferencial por Brometo de Etídeo (Be)/ Laranja de Acridina (LA)

O método de coloração pelo brometo de etídeo e laranja de acridina permite diferenciar as células viáveis daquelas em processo de morte celular por apoptose ou necrose, pela coloração diferencial por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (MCGAHON et al., 1995). A laranja de acridina consegue atravessar membranas celulares intactas e se liga ao DNA, conferindo uma aparência verde ao núcleo das células. O brometo de etídeo é incorporado principalmente por células com a membrana já danificada (não viáveis), ligando-se ao DNA e corando-o de laranja. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela laranja de acridina. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por brometo de etídeo.

Morfologicamente, observam-se alterações da membrana em ocorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose, caracterizadas pela perda da integridade da membrana plasmática, apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos (Fig. 10). Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (MAGALHÃES, 2009).

Metodologia experimental

Inicialmente, 5×10^4 células/poço foram tratadas com o A2CN por um período de 24 h em concentrações distintas. Após o tempo de incubação as células foram concentradas por centrifugação à 2000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado celular foi ressuspenso em 50 µL de PBS. Em seguida 1 µL de uma solução de brometo de etídeo e laranja de acridina foi adicionada a cada tubo, sendo uma alíquota retirada e adicionada em lâmina coberta com lamínula. Em seguida as lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência. As células foram observados num aumento de 400x.

Foram contadas 300 células em campo aleatório, em duplicata, para quantificação do percentual de cada evento celular (viáveis, apoptóticas e necróticas) para cada concentração testada. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman Keuls, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

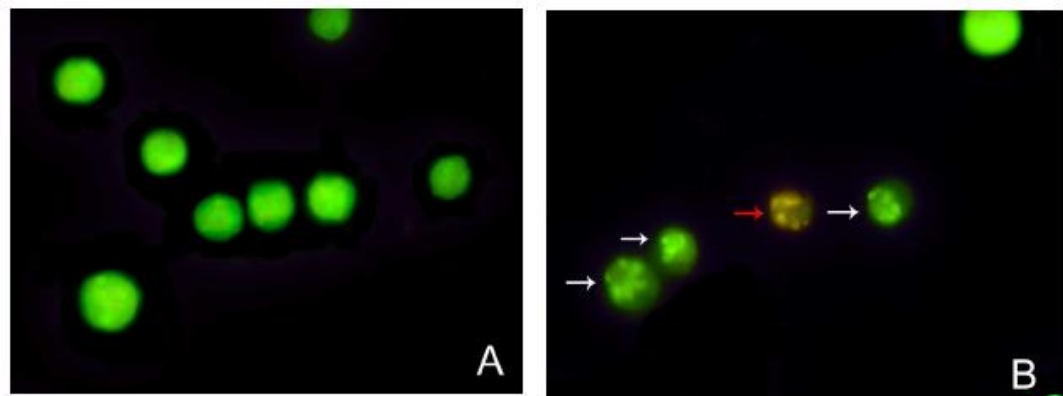


Figura 10: Células coradas com Brometo de etídeo e laranja de acridina. Em A observamos células viáveis coradas pela laranja de acridina. Em B visualizamos células apoptóticas (seta brancas) mostrando o núcleo fragmentado, e células necróticas coradas em laranja pelo brometo de etídeo (seta vermelha).

Fonte: FAHEINA-MARTINS, 2009.

3.3.7 Análise do Potencial Mitocondrial com Tetrametilrodamina (Ψ_m)

A apoptose pode ser ativada por duas vias, extrínseca e intrínseca. A via intrínseca envolve a participação da mitocôndria, sendo também denominada de via mitocondrial. Essa via mitocondrial é ativada pela saída do citocromo C da intermembrana mitocondrial para o citosol (BARNARD et al., 2007). A permeabilidade da membrana mitocondrial para o citocromo C é determinada pela formação de um poro de membrana que altera o potencial mitocondrial. Dessa maneira, detecções de alterações no potencial de membrana mitocondrial resultam da ativação da via intrínseca da apoptose.

Metodologia experimental

As células HL-60 foram plaqueadas em placas com 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e tratadas com o A2CN (5, 10 e 20 μ M). Como controle positivo desse ensaio foi utilizado o protonóforo CCCP (carbonil cianeto m-clorofenildrazona), na concentração de 50 μ M, por 15 min. Após 24 h de incubação com a substância, as células foram lavadas com meio de cultura e marcadas com 150 nM de Tetrametilrodamina (Sigma). Em seguida, elas foram encubadas por 20 min a 37°C, no escuro. Após esse tempo, as células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS para posterior análise em citômetro FACS Calibur (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) no filtro FL-2.

3.3.8 Análise do Ciclo Celular

Esse ensaio baseia-se no uso do iodeto de propídeo (PI), um corante catiônico que entra nas células cuja membrana está rompida e liga-se aos ácidos nucleicos. Quando há remoção do RNA pelo tratamento da amostra com RNase ou pelo uso de soluções hipotônicas, a emissão do PI é proporcional ao conteúdo de DNA e então o percentual de células em cada fase do ciclo celular pode ser quantificado por citometria de fluxo. As células apoptóticas possuem um conteúdo hipodiploide (sub-G1), podendo ser discriminada daquelas que possuem conteúdo normal de DNA (diplóide), sendo este um método indicativo de fragmentação do DNA (RICCARDI; NICOLETTI, 2006).

Metodologia experimental

As células HL-60 foram plaqueadas em placas com 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e tratadas com o A2CN (5, 10 e 20 μ M). Após 24h de exposição, as amostras foram centrifugadas (1.500 rpm, 5 min) e ressuspensas em uma solução hipotônica contendo 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de triton X-100 e 50 mg/L de PI (Sigma Aldrich, EUA). As amostras foram incubadas 30 min, sob refrigeração e no escuro. A leitura no citômetro de fluxo (FASC Calibur BD, EUA) foi feita em FL- 2.

3.3.9 Análise de Dados

Os dados experimentais de citotoxicidade foram obtidos a partir de três ensaios independentes, onde cada concentração foi testada em triplicata. Os gráficos obtidos expressam a absorbância em porcentagem em função da concentração das substâncias, onde os dados mostram a média \pm o erro padrão da média (EPM) e analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Também foi determinada a CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% dos resultados) a partir da regressão não linear. O programa estatístico utilizado para análise dos dados e produção dos gráficos foi o Prism versão 5.1 (GraphPad Software Incorporated, EUA).

Os dados dos experimentos em citometria de fluxo foram obtidos por meio de três ensaios onde cada concentração foi testada em duplicata, sendo feita a aquisição de 10.000 eventos por amostra. Os dados foram analisados primeiramente usando-se o software WinMDI para produção dos histogramas. Os dados analisados estatisticamente foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparados por Análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância foi de 5%. O programa estatístico utilizado foi o Prism versão 5.1 (GraphPad Software Incorporated, EUA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS AMBH

O potencial citotóxico dos adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman foi primeiramente avaliado na linhagem HL-60 com período de incubação de 24 horas pelo teste de redução do MTT em concentrações que variaram de 3,125 à 100 μ M. A tabela 2 mostra a CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular) de trinta substâncias diferentes.

Os compostos A2CN, A3CN e A4CN (isômeros de posição), e A7CN, A13CN, A14CN, A2CO₂CH₃, A3CO₂CH₃, A4CO₂CH₃, A13CO₂CH₃ e A14CO₂CH₃ apresentaram alto potencial citotóxico. Por estarem entre os compostos mais potentes avaliados, os três isômeros (A2CN, A3CN e A4CN) foram escolhidos para dar continuidade aos estudos de citotoxicidade frente outras linhagens leucêmicas e células não tumorais, como PBMC.

Tabela 2: Atividade citotóxica de AMBH na linhagem HL-60 num período de 24 horas de incubação determinado pelo ensaio do MTT. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni.

Substâncias	CI ₅₀ (μM)	\pm Desvio Padrão
A2CN	22,39	\pm 4,2 (18,19 à 26,59)
A3CN	17,28	\pm 3,9 (13,38 à 21,18)
A4CN	24,28	\pm 4,2 (20,08 à 28,48)
A7CN	27,16	\pm 3,9 (23,26 à 31,06)
A10CN	> 100	
A11CN	88,10	\pm 4,2 (83,9 à 92,3)
A12CN	73,7	\pm 4,2 (69,5 à 77,9)
A2CO ₂	29,14	\pm 2,9 (26,24 à 32,04)
A3CO ₂	39,35	\pm 3,4 (35,95 à 42,75)
A4CO ₂	45,65	\pm 3,9 (41,75 à 49,55)
A7CO ₂	73,76	\pm 3,1 (70,66 à 76,86)
A10CO ₂	>100	
A11CO ₂	> 100	
A12CO ₂	63,44	\pm 4,2 (59,24 à 67,64)
BzCN	103,5	\pm 2,6 (100,9 à 106,1)
4FCN	74,12	\pm 2,6 (71,52 à 76,72)
4ClCN	>>100	
PIPCN	103,9	\pm 2,9 (100,5 à 107,3)
A1CO ₂ Me	>>100	
4FCO ₂ Me	105,9	\pm 2,9 (103 à 108,8)
4ClCO ₂ Me	40,29	\pm 2,9 (37,39 à 43,19)
PIPCO ₂ Me	>>100	
A14CN	25,47	\pm 3,3 (22,17 à 28,77)
A14CO ₂ CH ₃	30,31	\pm 2,9 (27,41 à 33,21)
A13CN	16,42	\pm 3,2 (13,22 à 19,62)
A13CO ₂ Me	30,6	\pm 2,7 (27,9 à 33,3)
P(OCH ₃)CO ₂ CH ₃	>>100	
P(CH ₃)CO ₂ CH ₃	>>100	
P(CH ₃ O) CN	>>100	
P(CH ₃)CN	>>100	

A citotoxicidade dos três isômeros (A2CN, A3CN e A4CN) testada nas linhagens de leucemia aguda, HL-60 e MOLT-4, durante 24 h de incubação, apresentaram efeito bastante semelhante como mostrado na figura 11. Os três compostos foram capazes de reduzir a viabilidade celular de maneira dependente da concentração.

Nas linhagens de leucemia crônica, K562 e K562-Lucena, as substâncias também apresentaram atividade citotóxica (Fig. 12), reduzindo a viabilidade de ambas as linhagens. No entanto, sua potência foi menor do que a observada nas linhagens de leucemia aguda. Dentre os três isômeros avaliados nessas duas linhagens, pode-se notar também que o composto A2CN apresentou-se mais potente do que o A3CN e A4CN.

Nos testes realizados após 72 horas de incubação com os isômeros nas linhagens HL-60 e MOLT-4 (Fig. 13), evidencia-se que os resultados obtidos foram bastante próximos dos observados com 24 horas de incubação, indicando que o efeito máximo é alcançado com 24 horas de incubação nas linhagens de leucemia aguda. O A4CN, entretanto, foi o único composto que apresentou uma diferença considerável na linhagem MOLT-4, com redução da CI_{50} de 32,12 μ M, após 24 horas de incubação, para 13 μ M, após 72 horas, mostrando um efeito dependente da concentração e do tempo dessa substância frente esta linhagem.

Nas linhagens K562 e K562-Lucena observa-se que houve um aumento da citotoxicidade dos três compostos quando incubados por 72 h. Os valores de CI_{50} foram reduzidos, se comparados com os resultados de 24 horas, de 58,38 μ M para 32,28 μ M (A2CN); 73,42 μ M para 38,02 μ M (A3CN) e de 95,53 μ M para 49,33 μ M (A4CN) em K562. Na linhagem K562-Lucena, esses valores passaram de 60,79 μ M para 27,49 μ M (A2CN); 75,09 μ M para 27,99 μ M (A3CN) e de 122,3 μ M para 27,79 μ M (A4CN), revelando que essas substâncias atuaram de forma concentração e tempo dependente frente estas linhagens.

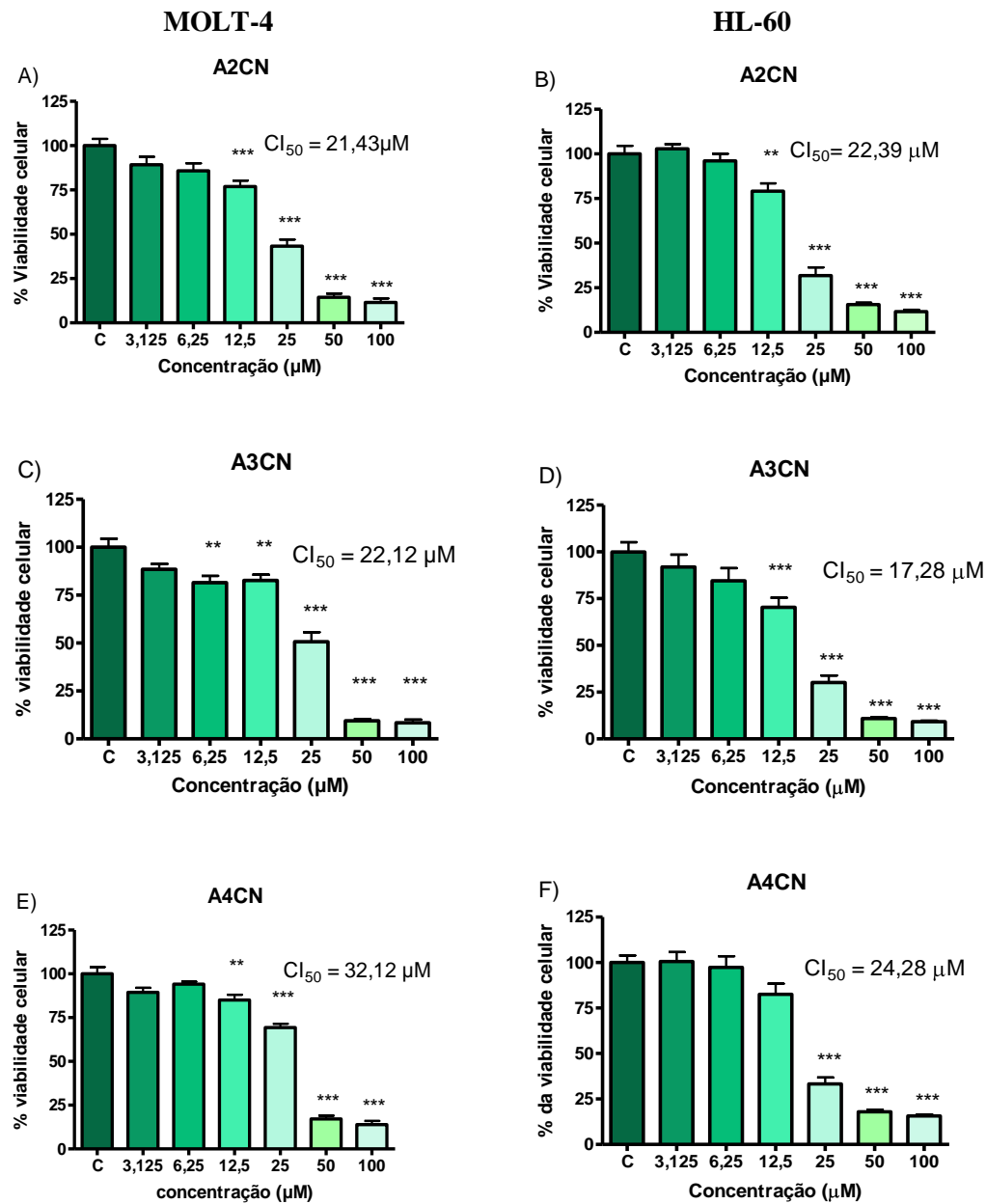


Figura 11: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens MOLT-4 (A, C, E) e HL-60 (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 24 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

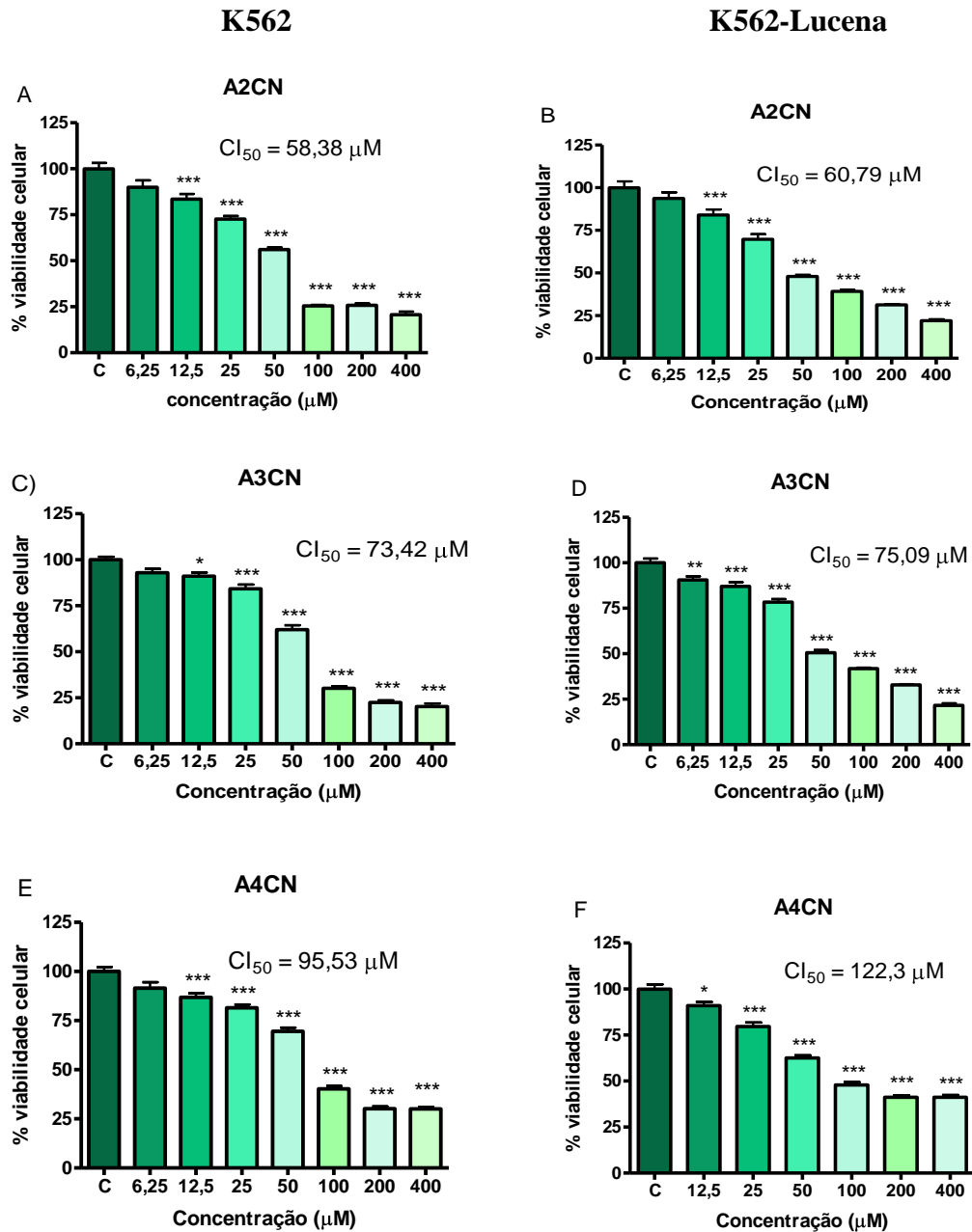


Figura 12: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens K562 (A, C, E) e K562 Lucena (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

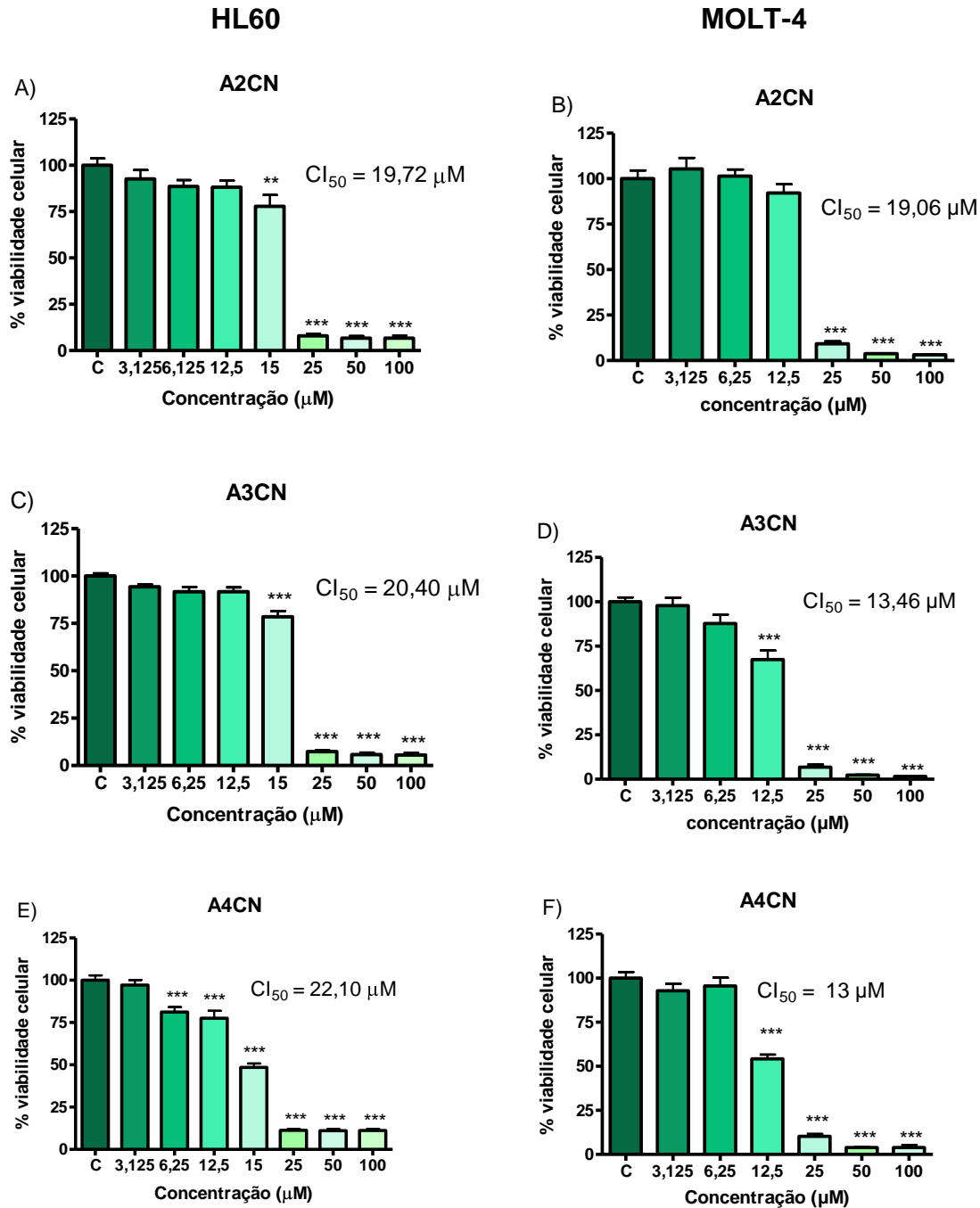


Figura 13: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens HL-60 (A, C, E) e MOLT-4 (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 72 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

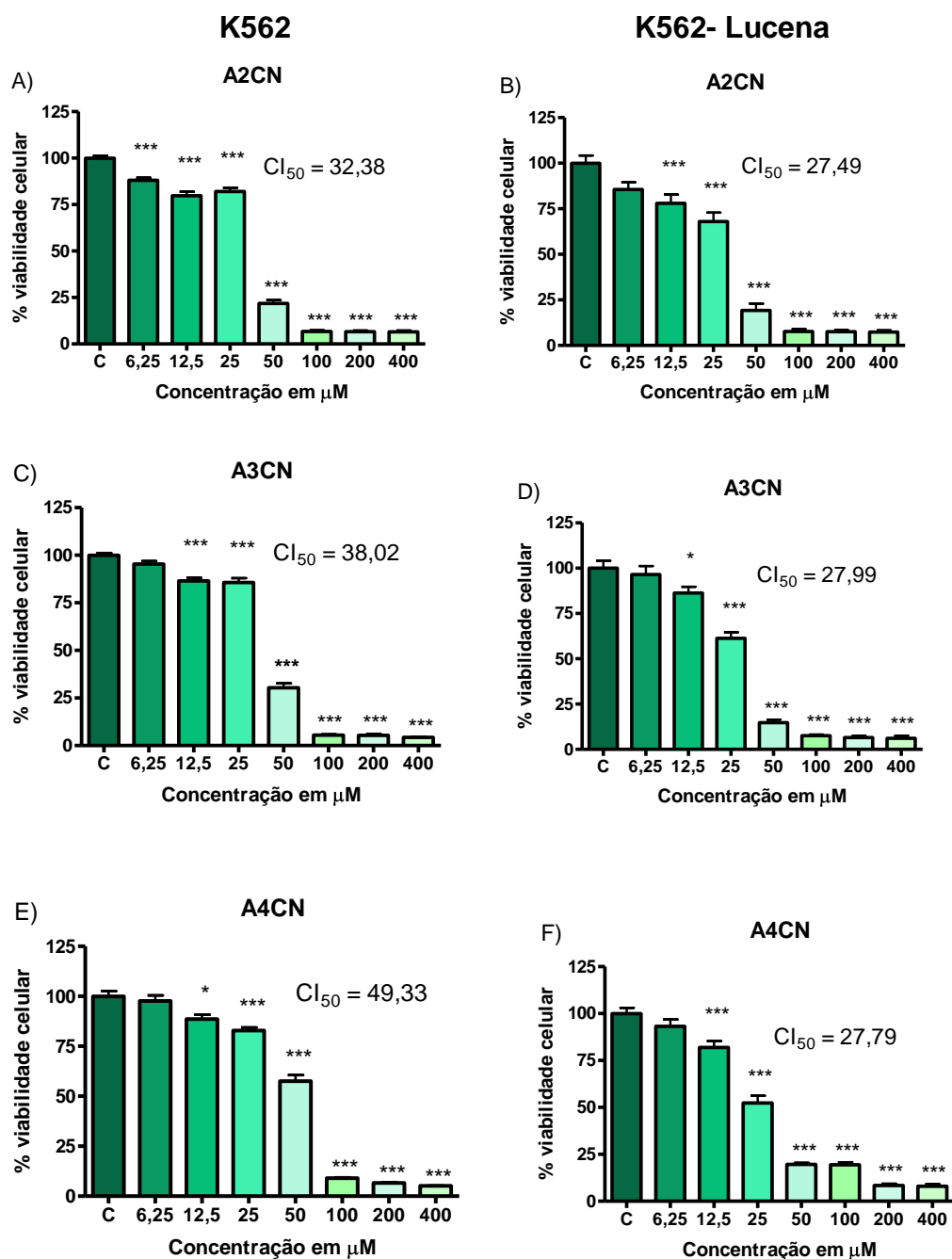


Figura 14: Atividade citotóxica dos compostos A2CN (A, B), A3CN (C, D), A4CN (E, F) nas linhagens K562 (A, C, E) e K562-Lucena (B, D, F) determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 72 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para comprovar a potência citotóxica da substância avaliada pelo ensaio do MTT, outra ferramenta de citotoxicidade foi usada, o teste de Captação do Vermelho Neutro. Pode-se notar que o resultado obtido em HL-60 pelo CVN (Fig. 15), cuja CI_{50} foi igual a $31,02 \pm 3,7$, assemelhou-se ao observado no ensaio do MTT ($CI_{50} = 22,39 \pm 4,2$), confirmando o potencial citotóxico da substância.

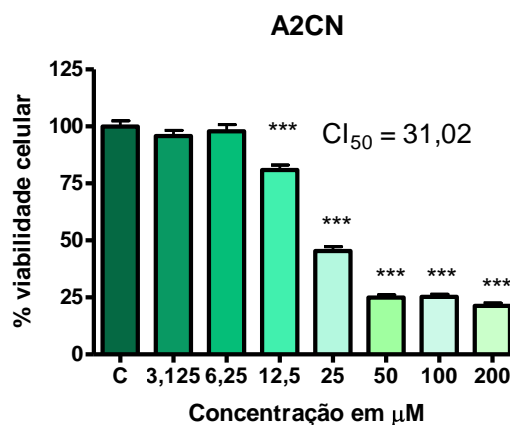


Figura 15: Atividade citotóxica do composto A2CN em HL-60 determinada pelo ensaio do CVN num período de incubação de 24 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

No ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), que são células não tumorais, o A2CN apresentou CI_{50} igual a 71,90 μM , com 24 horas de incubação (Fig. 16). Desse modo, na relação comparativa dos valores da CI_{50} de PBMC com as linhagens leucêmicas, foi observada uma maior seletividade do composto A2CN para as linhagens de leucemia. Pode ser constatado também um maior índice de seletividade frente às linhagens de leucemia aguda, HL60 (3,2 vezes) e MOLT-4 (3,3 vezes), do que as leucemias crônicas, K562 e K562-LUCENA, com 1,2 e 1,1 vezes respectivamente (Tabela 3).

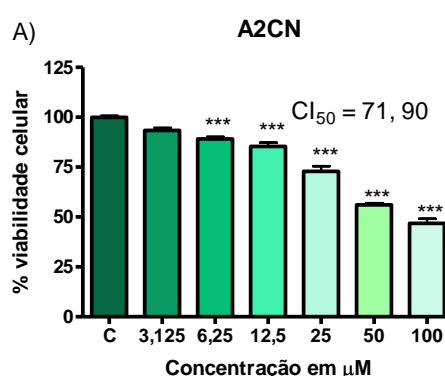


Figura 16: Atividade citotóxica do composto A2CN em PBMC determinada pelo ensaio do MTT num período de incubação de 24 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A CI_{50} foi expressa como a média \pm o desvio padrão.

Linhagem	CI_{50} (μM)	Índice de seletividade
HL-60	22,39	3,2
MOLT-4	21,43	3,3
K562	58,38	1,2
K562-LUCENA	60,79	1,1
PBMC	71,90	-

Tabela 3: Avaliação citotóxica do composto A2CN na linhagem HL-60, MOLT-4, K562, K562-LUCENA e em PBMC após 24 horas de incubação. A tabela apresenta os valores de CI_{50} e o índice de seletividade, que foi calculado tomando como base os dados obtidos das linhagens leucêmicas (CI_{50} em PBMC / CI_{50} em linhagem leucêmica).

4.2 COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR LARANJA DE ACRIDINA E BROTETO DE ETÍDEO (LA/BE)

A coloração das células com BE/LA, observadas em microscópio de fluorescência, permitiu calcular a porcentagem de células viáveis, necróticas e apoptóticas. O resultado desta análise pode ser observado na figura 17. Percebemos neste gráfico que no controle mais de 90% das células são viáveis. Após o tratamento com 5 μM com A2CN, identificou-se uma redução significativa no número de células viáveis, com conseqüente aumento de células apoptóticas, não ocorrendo aumento significativo de células necróticas. Após o tratamento com 20 μM observamos que a quantidade de células apoptóticas ultrapassou a porcentagem de células viáveis, não ocorrendo elevação do número de células necróticas em níveis significativos.

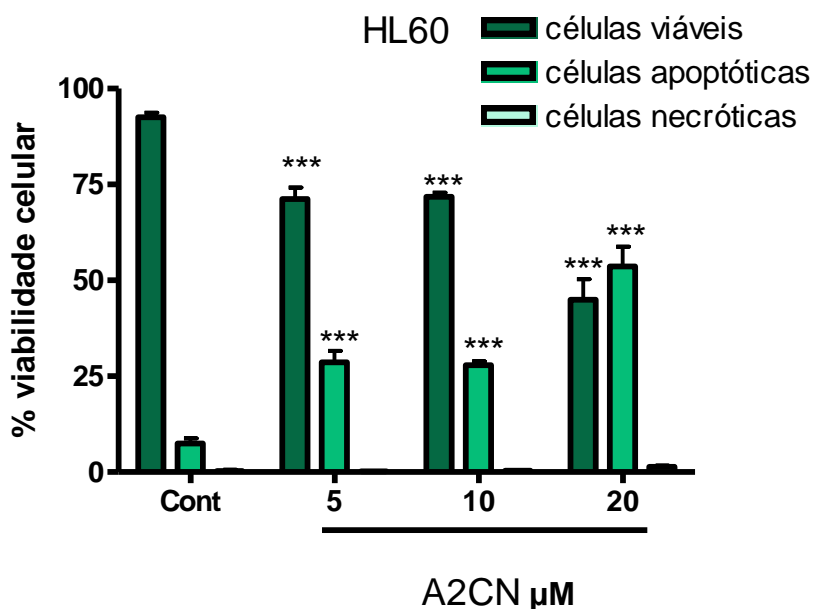


Figura 17: Efeito do A2CN na linhagem HL-60 analisado pela coloração diferencial com brometo de etídeo/laranja de acridina, após 24 horas de tratamento. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido Student Newman-keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRANA MITOCONDRIAL (Ψ_m)

Para verificar se a via mitocondrial estava envolvida no processo de indução da morte celular, foi avaliada a variação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) induzido pelo composto A2CN, com o fluorocromo TMRM em citometria de fluxo. O composto A2CN causou despolarização da membrana mitocondrial significativa a partir da concentração de 10 μ M com período de incubação de 24 horas (Fig. 18).

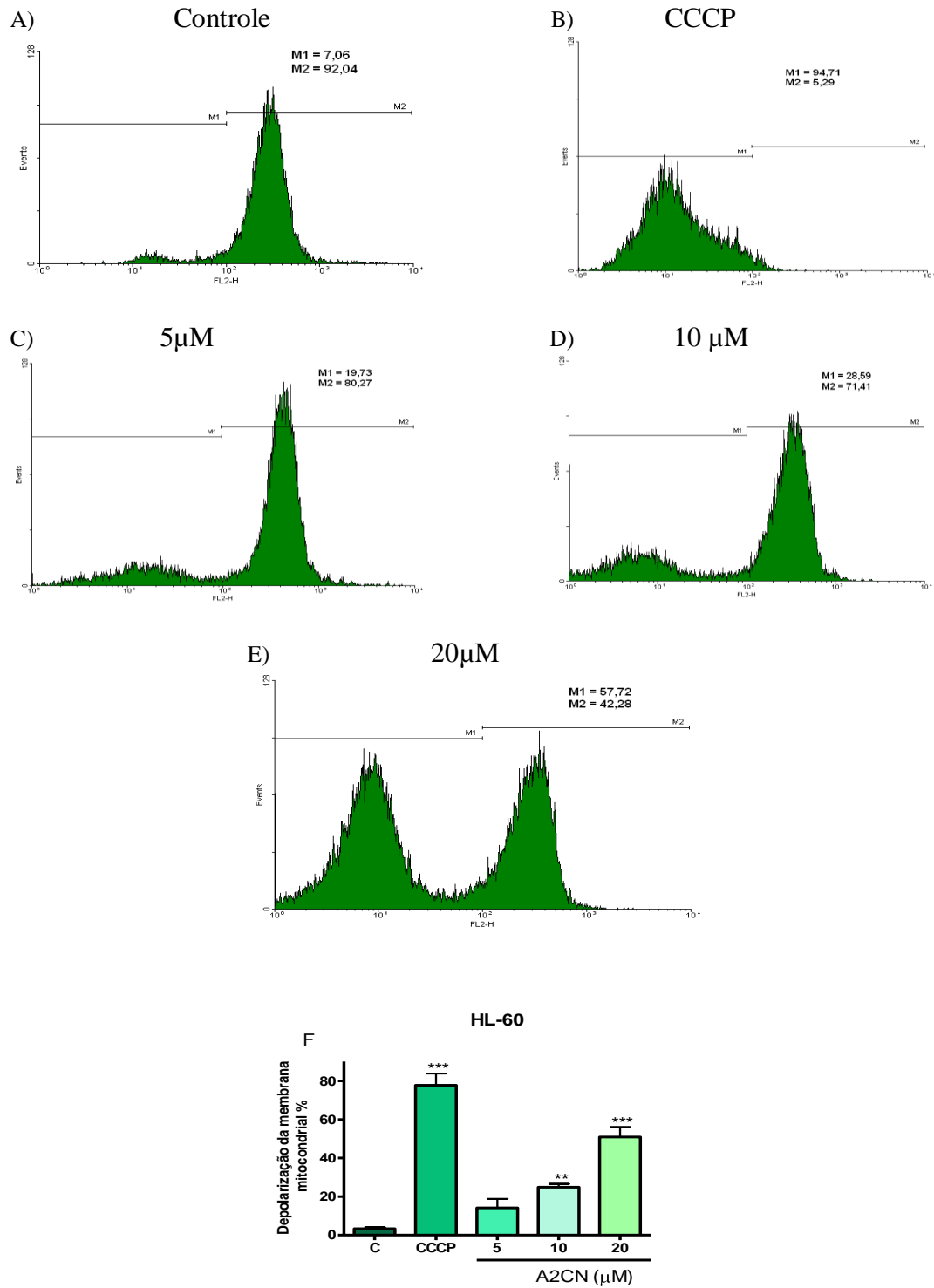


Figura 18: Análise da variação do potencial transmembrânico da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo em células HL-60, com 24 horas de incubação. O CCCP foi utilizado como controle positivo. A área representada por M2 é a população de células com membrana mitocondrial polarizada e alta emissão de fluorescência, os resultados analisados com o software WinMDI. O gráfico (F) corresponde a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4 ESTUDO DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DO DNA

A progressão das células nas fases do ciclo celular foi avaliada em citometria de fluxo usando o fluoróforo Iodeto de Propídeo (PI). A linhagem HL-60 tratada com A2CN por 24 horas apresentou uma parada na fase S do ciclo celular com a concentração de 5 μ M. Nas concentrações maiores (10 e 20 μ M) houve redução no conteúdo de DNA nas fases G₁, S e G₂/M, como consequência do aumento significativo da fração hipodiploide (sub-G₁) (Fig. 19). Este é um indicativo de que está ocorrendo a fragmentação do DNA, que representa uma característica do processo de morte por apoptose.

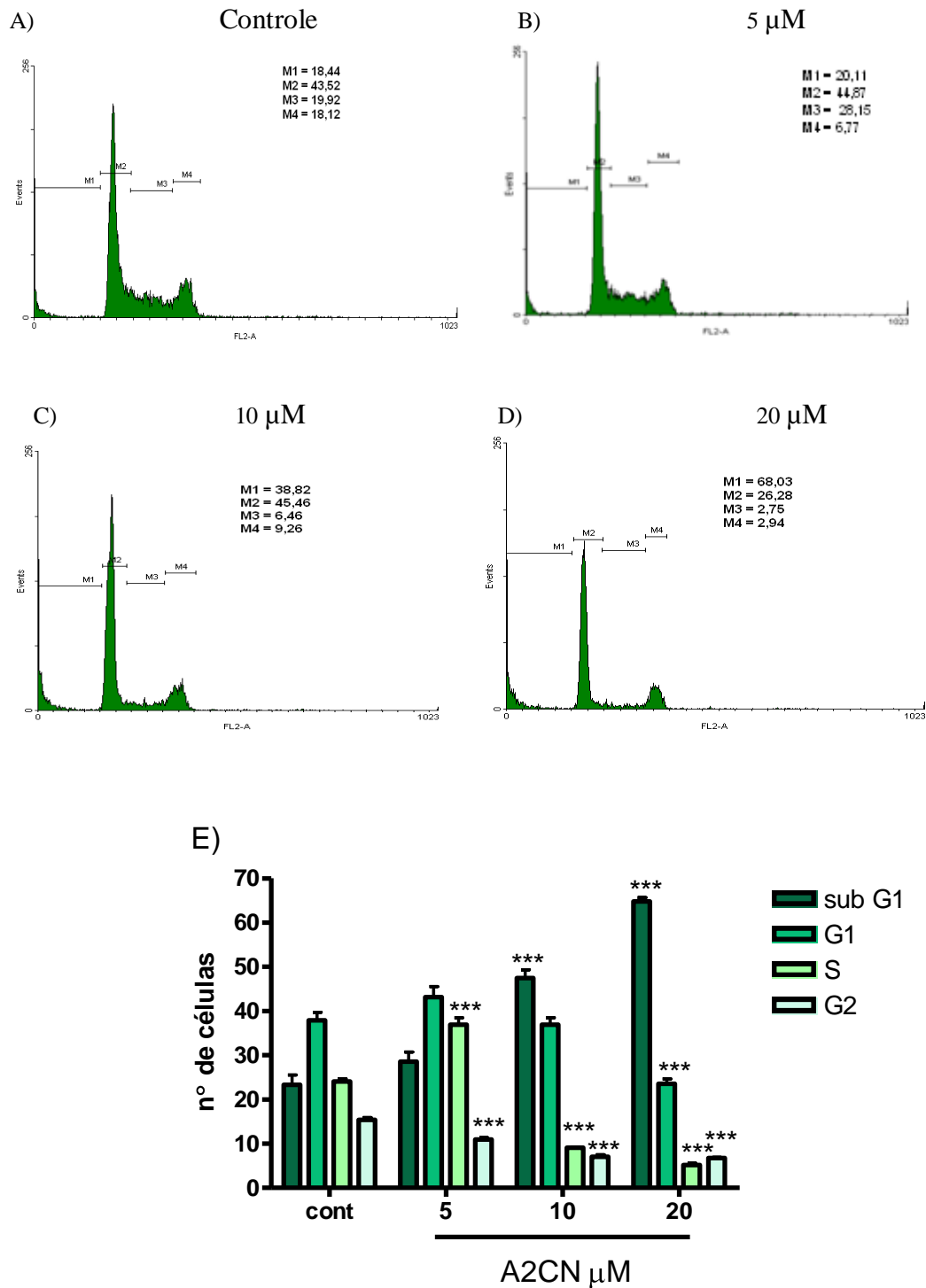


Figura 19: Efeitos no ciclo celular e no conteúdo de DNA da linhagem HL-60 avaliadas por citometria de fluxo. A área representada por M1 corresponde à fase subG1 (DNA fragmentado), M2 à G1, M3 à S e M4 à fase G2/M. 10000 eventos foram mensurados e os resultados analisados com o software WinMDI. O gráfico (E) corresponde a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos a aplicação da quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas e alguns tipos de tumores sólidos (LENS, 2003), no entanto as taxas de incidência e mortalidade ainda permanecem elevadas. Há, portanto, uma clara e urgente necessidade de identificar, avaliar e desenvolver novos e mais eficientes fármacos para o tratamento dessas doenças.

A cultura de células tumorais é uma ferramenta rotineiramente utilizada para o descobrimento de agentes que possuam potencial anticâncer (BAILLY, 2009; EISENBRAND et al., 2002). De fato, aproximadamente 75% das publicações na área do câncer são baseadas no uso de linhagens celulares e na realização de testes *in vitro* para avaliar a citotoxicidade e o mecanismo de ação em nível celular e molecular de novos compostos (AGGARWAL et al., 2009; FOUCHE et al., 2008; SCHRÖTEROVÁ et al., 2009).

A morte celular desempenha um papel importante no desenvolvimento e na homeostase dos tecidos normais (BENS e YAU, 2008; JAYSON e HARRIS, 2006). Um desequilíbrio entre proliferação e morte celular é a ligação para doenças humanas, incluindo câncer, doenças auto-imune, neurodegenerativas, infecções virais e AIDS (CRAGG e NEWMAM, 2005; SASSIOTO, 2004). A interferência nessa desregulação é a base da terapia do câncer, seja pela ação de produtos químicos ou físicos, tais como quimioterapia e radioterapia.

O mecanismo de ação de fármacos antitumorais envolve complexas vias de respostas aos danos no DNA, que apesar de uma extensa literatura requer mais estudos com a finalidade de melhor compreendê-las. A diversidade de resposta dos tumores, além da resistência adquirida ou intrínseca a agentes citotóxicos continua sendo o principal obstáculo no tratamento do câncer (SARKARIA et al., 2008).

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman são compostos sintéticos os quais têm sido atribuídas diversas propriedades, tais como, bioatividade contra *Plasmodium falciparum* (NARENDER et al., 2005), *Biomphalaria glabrata*, um hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (VASCONCELLOS et al., 2006), *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* (JÚNIOR et al., 2010), *Trypanosome cruzi* (SANDES, 2010).

Estudos envolvendo a atividade anticancerígena dessas substâncias têm sido delineados mostrando que os AMBH possuem efeito citotóxico sobre diferentes linhagens tumorais, porém essa atividade se expressa de forma distinta de acordo com a linhagem

testada (KOHN, 2006). Nesse trabalho Kohn observou que os adutos aromáticos eram mais bioativos do que os alifáticos. As relações de estrutura atividade biológica indicaram que a máxima atividade antiproliferativa, estava relacionada com a presença de grupos elétron-retiradores no anel aromático. Por outro lado, a presença de grupos elétron doadores apresentaram uma atividade muito baixa ou foram destituídos de atividade citotóxica significativa (KOHN, 2006).

Considerando que os AMBH possuem atividade citotóxica frente várias linhagens cancerígenas, e que este efeito é diferenciado de acordo com a linhagem tumoral testada, foi objetivo deste trabalho avaliar a atividade dessas substâncias sobre cultura de células leucêmicas e células não tumorais *in vitro* ainda não estudadas, bem como, avaliar o tipo de morte celular induzida por estas moléculas.

Inicialmente foi avaliada a atividade citotóxica de trinta AMBH usando ensaio de citotoxicidade basal de redução do MTT, sobre células leucêmicas (HL-60, MOLT-4, K562 e K562-LUCENA) e células não tumorais (PBMC). Essa técnica, que avalia a capacidade metabólica da célula, foi escolhida por ser bastante utilizada em ensaios de viabilidade celular, sendo capazes de detectar diferentes tipos de danos na célula (HATOK et al., 2009).

Os resultados demonstram que os compostos com grupamento nitro ligado ao anel aromático (A2CN, A3CN, A4CN, A2CO₂CH₃, A3CO₂CH₃ e A4CO₂CH₃) e os que possuem dois anéis aromáticos condensados em sua estrutura (A13CN, A14CN, A13CO₂CH₃ e A14CO₂CH₃), testadas na HL60, apresentaram maior potência citotóxica que as demais substâncias (tabela 2). Sendo assim, os três isômeros (A2CN, A3CN e A4CN), estando entre os mais potentes, foram escolhidos para serem testados em outros tipos de leucemia.

Nas demais linhagens leucêmicas testadas (MOLT-4, K562, K562-Lucena), os três isômeros também apresentaram atividade antiproliferativa, sendo as linhagens de leucemia aguda, HL-60 e MOLT-4, as mais sensíveis num período de 24 horas de tratamento. Ainda pode ser observado que os compostos reduziram a viabilidade celular de maneira semelhante com 72 horas de incubação nessas duas linhagens, revelando que o efeito citotóxico máximo é alcançado com 24 horas de incubação.

Embora as células de leucemia crônica, K562 e K562-Lucena, apresentassem uma menor sensibilidade, a atividade citotóxica dos compostos foi maximizada com a elevação do período de tratamento de 24 para 72 horas, evidenciando que os isômeros atuaram de modo concentração e tempo dependentes nestas linhagens.

Devido a linhagem HL-60, de leucemia mielóide aguda, ter se mostrado uma das mais sensíveis à ação dos compostos, esta linhagem foi escolhida para dar continuidade aos estudos farmacológicos. Como não foi constatado diferença significativa entre o potencial citotóxico dos três isômeros ($A2CN = 22,39 \pm 4,2$; $A3CN = 17,28 \pm 3,9$ e $A4CN = 24,28 \pm 4,2$) nesta linhagem, os testes posteriores foram realizados apenas com o composto A2CN.

A citotoxicidade desencadeada por determinado composto pode ser apresentado pela alteração de diversas funções e/ou estruturas celulares, como por exemplo, redução da atividade metabólica, alteração dos níveis enzimáticos e danos a membranas celulares (EISENBRAND et al., 2002; KIM et al., 2009). Dependendo do tipo celular e da natureza química do composto, um método pode ser inadequado ou pouco sensível em determinadas condições. Sendo assim, para se obter uma estimativa adequada do potencial citotóxico de um composto, é necessário realizar ensaios que avaliem diferentes parâmetros celulares (SCHRÖTEROVÁ et al., 2009).

Com esta finalidade, foi realizado o ensaio de captação do vermelho neutro que avalia a integridade da membrana lisossomal. A substância A2CN reduziu a viabilidade celular, avaliada pela técnica do vermelho neutro ($CI_{50} = 31,02 \pm 3,2 \mu M$), de modo semelhante ao observado pelo ensaio de redução do MTT ($CI_{50} = 22,39 \pm 4 \mu M$), comprovando a potência citotóxica do composto.

Alguns dos principais problemas apresentados pelos quimioterápicos são os efeitos colaterais, resultantes da baixa seletividade dos compostos utilizados no tratamento frente às células normais, como por exemplo, as células do sistema hematopoiético (CHARI, 2008). Para avaliar se o composto A2CN possuía uma possível seletividade, a citotoxicidade desta substância foi avaliada na cultura não tumoral, células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), pelo ensaio de redução do MTT.

Pode ser notado que o efeito do A2CN na viabilidade da cultura de células não cancerígenas ($CI_{50} = 71,90 \mu M$) foi menor do que o observado na linhagem leucêmica HL-60 ($22,39 \mu M$), sendo a seletividade do composto aproximadamente 3,2 vezes maior para a linhagem tumoral do que para as células normais. Devido às substâncias com propriedades antineoplásicas, em sua maior parte, terem como alvo moléculas e/ou processos celulares compartilhados por células normais e tumorais, é de se esperar algum nível de toxicidade também nas células normais.

Após realizar os ensaios de citotoxicidade sobre as linhagens tumorais e normais, foi objetivo desse trabalho avaliar qual o mecanismo de morte celular induzido pelo A2CN. Os seguintes ensaios foram realizados para avaliar se o A2CN induzia morte por apoptose ou

necrose: análise morfológica por coloração diferencial com Brometo de Etídeo e Laranja de acridina (BE/LA), análise da fragmentação do DNA e alteração no potencial de membrana mitocondrial.

A apoptose é um processo de fundamenta importância para a homeostase em vários sistemas biológicos, desempenhando um papel essencial na regulação da resposta a fármacos citotóxicos e na eliminação de células senescentes. Esse tipo de morte é identificada por uma série de alterações morfológicas na célula: diminuição do volume celular, perda de contato, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, e alteração no potencial transmembrânico mitocondrial (NAKARUMA et al., 2002; SIRAKI et al., 2002; YANG et al., 2003; KUMAR et al., 2005). Drogas que induzem morte celular por apoptose em linhagens de células tumorais podem ser úteis na quimioterapia (ZAMAI et al., 2001; BRADY, 2004).

Os resultados da coloração diferencial com BE/LA evidenciaram que células HL-60, tratadas com o A2CN, mostraram alterações características principalmente de apoptose a partir da concentração de 5 μ M.

Para aprofundar os estudos dos efeitos celulares do A2CN, foram realizados experimentos em HL-60 utilizando citometria de fluxo. Nesses experimentos foram avaliados o ciclo celular, fragmentação do DNA e despolarização da membrana mitocondrial. A citometria de fluxo é uma ferramenta bastante valiosa para estudos estruturais e funcionais das células, sendo considerada rápida, precisa e com boa aplicação para investigação de compostos com atividade antitumoral. Dentre uma série de possibilidades pode ser usada na pesquisa básica em biologia molecular e bioquímica da apoptose, bem como na clínica para monitoramento de sinais iniciais da apoptose em tumor de pacientes como consequência de alguns protocolos de tratamento. A utilização de fluorocromos que possuem a capacidade de intercalação com o DNA (iodeto de propídeo) permite identificar a viabilidade celular e a fragmentação do material genético. As características inerentes a morfologia das células apoptóticas como condensação da cromatina e a redução do volume celular são detectadas por meio do desvio da luz incidida sobre a célula para frente e para o lado (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; RAMANATHAN, 1997; LIMA, 2005).

Os estudos realizados com citometria de fluxo revelaram uma fragmentação do DNA, que seria representada pela elevação de um pico antes da fase G1, denominado sub-G1, representando o DNA subdiploide. O DNA é fragmentado em intervalos de 180-200 pares de base, sendo uma das características bioquímicas mais importantes da apoptose (HANAHAHAN et al., 2000). Enquanto a necrose, a fragmentação do DNA é randômica (BREDESEN, 2007). Logo, estes resultados corroboram com os dados anteriores indicativos de apoptose.

Tendo em vista que a mitocôndria também desempenha um papel chave na deflagração da apoptose em certas condições, foi realizado o ensaio de despolarização mitocondrial, afim de melhor compreender o mecanismo de morte. Na apoptose via mitocondrial ocorre a formação de um poro de permeabilização na membrana da mitocôndria havendo uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial, que pode ser quantificado por fluorocromos (KROEMER et al., 1997). O composto A2CN foi capaz de promover a dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial com 24 horas de incubação, confirmando mais uma vez que a substância induz morte celular principalmente por apoptose.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- Os três isômeros, A2CN, A3CN e A4CN, apresentaram atividade antileucêmicas frente às quatro linhagens avaliadas: HL-60, MOLT-4, K562 e K562-Lucena;
- As linhagens de leucemia aguda, HL-60 e MOLT-4, foram mais sensíveis a ação dos três isômeros do que as linhagens de leucemia crônica, K562 e K562-Lucena;
- Os três compostos possuíram efeito semelhante nas linhagens de leucemia aguda;
- A substância A2CN se mostrou ser o mais potente frente às linhagens de leucemia crônica do que o A3CN e A4CN;
- Os três compostos apresentaram menor citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano;
- O composto A2CN induziu fragmentação do DNA em HL-60
- A substância A2CN induziu despolarização da membrana mitocondrial em HL-60
- A2CN reduziu a viabilidade por induzir principalmente apoptose em HL-60

Referências

7. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; DANDA, D.; GUPTA, S.; GEHLOT, P. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. **Biochem Pharmacol.**, v. 78, n. 9, p. 1083- 1094, 2009.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; **Biologia Molecular da Célula**. Tradução Ana Letícia de Souza Vanz... 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 1396p, 2010.
- ALENZI, F. Q.; LOTFY, M.; WYSE, R. Swords of cell death: caspase activation and regulation. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 11, n. 2, p. 271- 280, 2010.
- BAETU, T. M.; HISTOCOTT, J.; On the trail to apoptosis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, n. 3, p. 199-207, 2002.
- BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. **Biochem Pharmacol.**, v. 77, n. 9, p. 1447- 1457, 2009.
- BARNARD, P. J.; BERNES-PRICE, S. J.; Targeting the mitochondrial cell death pathways with gold compound . **Coord Chem Rev.**, v. 251, p. 1889-1902, 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA C. A. M.; Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2ª edição. Artmed Editora, 2008.
- BARREIRO, E. J.; A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, 1 (1), 26-34, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PORNFAR). **Revista Química Nova**. Rio de Janeiro, v.28, suplemento S56-S63, 2005.
- BARBERATO FILHO, S. Pesquisa e desenvolvimento de fármacos no Brasil: estratégias de fomento. 192f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- BARBOSA, T. P.; JUNIOR, C. G. L.; SILVA, F. P. L.; LOPES, H. M.; FIGUEIREDO, L. R. F.; SOUSA, S. C. O.; BATISTA, G. N.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (MBH): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **Eur. J. Med. Chem.**, 44: 1726, 2009.
- BASSAN, R.; GATTA, G.; TONDINI, C.; WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.50, n.3, p.223- 61, 2004.
- BAYLIS, A. B.; HILLMAN, M.E.D.; German Patent 2155113, 1972. **Chem. Abstr.** 77: 34174, 1972.

BENZ, C.C.; YAU, C. Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax, **Nat. Rev. Cancer**. v. 8, p. 875-879, 2008.

BERGER, U.; MAYWALD, O.; PFIRRMANN, M.; LAHAYE, T. .; HOCHHAUS, A.; HEITER, A.; HASFORD, J.; HEIMPEL, H.; HOSSFELD, D.K.; KOLB, K.J.; LOFFLER, H.; PRALLE, H.; QUEISSER, W.; HEHLMANN, R. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. **Leukemia**. V.19, n. 6, p. 984-989, 2005.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N.; Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, n.1, p.1 – 6, 1998.

BRADY, H. J. M.; Apoptosis methods and protocols. New Jersey: humana press, 2004.

BREDESEN, D. E.; Toward a mechanistic taxonomy for cell death programs. **Stroke**, v. 38, p. 652-660, 2007).

BURJANIVOVA, T. et al. Prenatal origin of childhood AML occurs less frequently than in childhood ALL. **Bmc Cancer**, v. 6, 2006.

BURZ, C.; BERINDAN-NEAGOE, I.; BALACESCU, O.; IRIMIE, A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncol.**,v. 48, n. 6, p. 811 - 821, 2009.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA. R.; KROEMER, G.; Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**.;23:2825-837. 2004.

CHARI, R. V.Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc Chem Res.**,v. 41, n. 1, p. 98 - 107, 2008.

CLARK, S.S.; PERMAN, S.M.; SAHIN, M.B.; JENKINS, G.; ELEGBEDE, J.A.; Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/ G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl transformed cells is to induce growth arrest. **Leukemia**. 16: 213–222. 2002.

CORTES, J.E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN,H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **Am J Med**. v. 100 , n. 5 , p. 555-570, 1996.

COTTER, T. G.Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat Rev Cancer**,v. 9, n. 7, p. 501 - 507, 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol**. V. 100, p. 72-79, 2005.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J.; Cell death: critical control points. **Cell**.116:205-19. 2004.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F.; Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DEBATIN, K. M. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. **Toxicol. Lett.**, n. 113, p. 41-48, 2000.

DE SOUZA, R. O. M. A.; PEREIRA, V. L. P.; MUZITANO, M. F.; FALCÃO, C. A. B.; ROSSI-BERGMANN, B.; FILHO, E. B. A.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; High selective leishmancidal activity of 3-hydroxy-2methylene-3-(4-bromophenyl) propanenitrile and analogous compound. **Eur. J. Med. Chem.**, 42:99, 2007.

DEWICK, P. M.; Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach, 3rd ed., Wiley: United Kingdom, 2009.

DIMRI, G. P.; What has senescence got to do with cancer ? **Cancer Cell.**;7:505-12. 2005.

EISCHEN, C. M. et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. **Blood.**, n. 90, p. 935-943, 1997.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDS, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; LEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193 - 236, 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**. v. 35, p. 495-516, 2007.

FAHEINA-MARTINS, G.V.; **Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*.**, 125 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2009.

FESIK, S. W.; Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat Rev Cancer.**,v. 5, n. 11, p. 876 - 885, 2005.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T.; Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 4, p. 1907 - 1916, 2005.

FLETCHER, J. I.; HUANG, D. C.; Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums. **Cell Cycle**,v. 7, n. 1, p. 39-44, 2008.

FOSTER, I.; Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**. v. 14, p.144-149, 2008.

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; SENABE, J.; *In vitro* anticancer screening of South African plants. **J Ethnopharmacol.**, v. 119, n. 3, p. 455 - 461, 2008.

FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. R. S. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3727 - 3729, 1999.

FRESHNEY, I.; Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, 17: 213-230, 2001.

FROMM, M. F.; The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. **Advan. Drug Deliv. Rev.**; 54:1295-1310. 2002.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ.**, v. 14, n. 7, p. 1237 - 1243, 2007.

GANELLIN, C. R.; Medicinal Chemistry Principles and Practice; **Science**, 2000.

GARRIDO, C.; GALLUZZI, L.; BRUNET, M. PUIG, P.E. DIDELOT, C.; KROEMER, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death Differentiation**. v. 13, p. 1423-1433, 2006.

GILLILAND, DG; JORDAN, CT ; FELIX, CA. The Molecular Basis of Leukemia. **Hematology - Am Soc Hemato Educ Program** , v. 1, p.80-97, 2004.

GINALDI, L.; DE MARTINIS, M.; MATUTES, E.; FARAHAT, N.; MORILLA, R.; CATOVSKY, D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. **J. Clin. Pathol.**, v. 51, n. 5, p. 364-369, 1998.

GLOVER, C. J.; RABOW, A. A.; ISGOR, Y. G.; SHOEMAKER, R. H.; COVELL, D. G.; Data mining of NCI's anticancer screening database reveal mitochondrial complex inhibitor cytotoxic to leukemia cell lines. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, p. 331-340, 2007.

GOLDIN, L. R.; SLAGER, S. L. Familial CLL: genes and environment. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 339-345, 2007.

GOLDMAN, J. M.; Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia **Medicine**. 37(4). 2008.

GOLDSTEIN, L. J.; MDR1 gene expression in solid tumours. **European Journal of Cancer**. v.32A, p. 1039-1050, 1996.

GREAVES, M. F.; Molecular genetic, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur. J. Cancer**, v. 35, p. 1941-1953, 1999.

GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**. 1. São Paulo: BBS Editora, 2004.

GUPTA, S.; Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Life Sci.**, v.69, n. 25/26, p. 2957-2964, 2003.

HALLEK, M.; CHESON, B. D.; CATOVSKY, D.; CALIGARIS-CAPPIO, F.; DIGHIERO, G.; DOHNER, H.; HILLMEN, P.; KEATING, M. J.; MONTSERRAT, E.; RAI, K. R.; KIPPS, T. J. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5446-5456, 2008.

HAMBLIN, T. Historical Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Br. J. Haematol.**, v.111, p.1023-1034, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70,2000.

HATOK, J.; BABUSIKOVA, E.; MATAKOVA, T.; MISTUNA, D.; DOBROTA, D.; RACAY, P. *In vitro* assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. **Clin Exp Med.**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2009.

HEAD, D. R.; GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; Classification and Differentiation of the Acute Leukemias **Wintrobe's Clinical Hematology** 11nd. p. 2063-2076, 2004.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, n. 407, p. 770-776, 2000.

HIGUCHI, M., Regulation of mitochondrial DNA content and cancer. **Mitochondrion**, v.7, n.1/2, p.53-57, 2007.

HILL, B.; **Int. J. Oncol.** 9, 197. 1996.

JAYSON, G.; HARRIS, J. How participants in cancer trials are chosen: ethics and conflicting interests, **Nat. Rev. Cancer**. v. 6, p. 330-336, 2006.

JIANG, X.; WANG, X.; Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annu Rev Biochem.**, v. 73 , p. 87-103 , 2004.

JÚNIOR, C. G. L.; Síntese de dezesseis adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: Bioavaliação contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* e análise da relação estrutura-atividade biológica. Dissertação. 2009.

JÚNIOR, C. G. L.; ASSIS, P. A. C.; SILVA, F. P. L.; SOUZA, S. C. O.; ANDRADE, N. G.; BARBOSA, T. P.; NERÍS, P. L. N.; SUGUNDO, L. V. G.; ANJOS, I. C.; CARVALHO, G. A. U.; ROCHA, G. B.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. **Bioorganic Chemistry**, 2010.

JÚNIOR, C. G. L.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; Morita-Baylis-Hillman adducts: biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganic e Medicinal chemistry**. 2012.

KABRIAIEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R. A.; Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. **Best Pract Res Clin Haematol**, 15:597-621, 2003.

KANTARJIAN, H. M.; DEISSEROTH, A.; KURZROCK, R.; ESTROV, Z.; TALPAZ, M.; Chronic myelogenous leukemia: a concise update. **Blood**. V. 82 , n. 3, p 791-703, 1993.

KEBRIAIEI, P.; LARSON, R. A.; Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Hematol**. ;10(4):284-9. 2003.

KELEKAR, A.; Autophagy. **Ann NY Acad Sci**.;1066:259-71. 2005.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, n. 26, p. 239-257, 1972.

KIM, R; EMI, M.; MATSUURA, K.; TANABE, K.; Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. **Cancer Gene Ther**. v. 14, n. 1, p. 1-11, 2007.

KIM, R.; TANABE, K.; UCHIDA, Y.; EMI, M.; INOUE, H.; TOGE, T.; Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Chemother. Pharmacol**. 2002.

KIM, H.; YOON, S. C.; LEE, T. Y.; JEONG, D.; Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicol Lett.**, v. 184, n. 1, p.13 - 177, 2009.

KOHN, L. K.; PAVAN, C.H.; VERONESE, D.; COELHO, F.; DE CARVALHO, J.E.; ALMEIDA, W.P.; Antiproliferative effect of Baylis–Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2006.

KRISKO, D.V.; BERGHE, T. Van Del; D’HERDE, K.; VANDENABEL, P. Apoptosis and Necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, 2008.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A.; Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol. Today** , v. 18, p. 44-55, 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.; Patologia: bases patológicas das doenças. 7 edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUNDU, M. K.; SUNDAR, N.; KUMAR, S. K.; BHAT, S. V.; BISWAS, S. V. N.; Anti-malarial activity of 3 hydroxyalkyl-2-methylene-propionic acid derivatives, **Bioorganic e Medicinal Chemistry letter**. 9, 731, 1999.

KUSUHARA, H.; SUZUKI, H.; NAITO, M.; TSURUO, T. SUGIYAMA, Y.; Characterization of Efflux Transport of Organic Anions in a Mouse Brain Capillary Endothelial Cell Line. **J Pharmacol Exp Ther** 285:1260-1265. 1998.

LEE, C. H.; Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters. **Methods Mol Biol**, v. 596, p. 325 - 340, 2010.

LEE, E. Y.; MULLER, W. J.; Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 2, n. 10, p. 1 - 19, 2010.

LEITE, J. C. A.; JÚNIOR, C. G. L.; SILVA, F. P. L.; SOUSA, S. C. O.; VASCONCELOS, M. L. A. A.; MARQUES-SANTOS, L. F.; Antimitotic activity on sea urchin embryonic cells of seven antiparasitic Morita-Baylis-Hillman adducts: a potential new class of anticancer drugs. **Medicinal Chemistry**. n. 8, p. 1003-1011, 2012.

LENARDÃO, J. E.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C.; “Green Chemistry” – Os princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quím. Nova**, 26:123, 2003.

LENS, H. J.; Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumour. **Cancer Treat. Rev.**, v. 29, suppl. 1, p. 41-48, 2003.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C.; Multidrug resistance proteins: role of Pglycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicol Appl Pharmacol** 204:216-237. 2005.

LI, H.; ZHU, H.; XU, C. J.; YUAN, J.; Cleavage of BID by caspase 8 mediates mitochondrial damage in the Fas pathways apoptosis. **Cell** , v. 94, n.4, p. 491 -501 , 1998.

LICHTMAN, M. A. AND LIESVELD, J. L.; Acute Myelogenous Leukemia. In: **Williams Hematology**, Chap. 93, p.1047, 6st edition. 2001.

LIGHTFOOT, T.; Aetiology of childhood leukemia. **Bioelectromagnetics**. Suppl 7:S5-S11, 2005.

LIMA, T. M.; Citometria de fluxo. In: PERES, C. M.; CURI, R.; Como cultivar células. 1.ed. Rio de Janeiro, RJ . Guanabara Kooga, p. 227-253. 2005.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUVERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, p 581-592, 1997.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G.; **J. Pathol.** 205, 275. 2005.

LUM, J. J.; DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B.; Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol.**6:439-48. 2005.

MADDIKA, S.; ANDE, S.R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZK, K.; ZUSE, A.; ESHIRAGUI, M.; MANDA, K.D.; WIECHEC, E.; LOS, M.; Cell survival, cell death and cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resit. Updat.**, 2007.

MARZOLINI C, TIRONA RG, KIM RB. Pharmacogenomics of the OATP and OAT families. **Pharmacogenomics**. 5:273-82. 2004.

MAY, J. E.; XU, J.; MORSE, H. R.; AVENT, N. D.; DONALDSON, C. Toxicity testing: the search for an *in vitro* alternative to animal testing. **Br J Biomed Sci.**, v. 66, n. 3, p. 160 - 165, 2009.

McGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R.; The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods cell biol.** v. 46, p.153 – 185, 1995).

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G.; Apoptosis in development. **Nature.**;407:796-801; 2000.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; HAUN, M.; Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos Sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters.** V. 142, p. 143-151, 2003,

MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 116, p. 237 - 242, 2000.

MINE, T. H.; **Fundamentos de toxicologia.** Atheneu, 2 ed. São Paulo, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – MS/INCA. (2012). Câncer - O que é . Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso em 12 de abril de 2012.

MITSCHER, L. A.; PILLAI, S. P.; GENTRY, E. J.; SHANKEL, D. M.; **Med. Res. Rev.** 19, 477. 1999.

MOLNÁR, J.; ENGI, H.; HOHMANN, J.; MOLNÁR, P.; DELI, J.; WESOLOWSKA, O.; MICHALAK, K.; WANG, Q. Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants. **Curr Top Med Chem.**, v. 10, n. 17, p. 1757 - 68, 2010.

MOOI, W. J.; PEEPER, D. S.; Oncogene-induced cell senescence - halting on the road to cancer. **N. Engl. J. Med.**;355:1037-1046. 2006.

MUSSER, J. H.; The practice of medicinal chemistry. **Academic Press**, pp.25-38,1996.

NARENDER, P.; SRINIVAS, U.; GANGADASU, B.; BISWAS, S.; RAO, V. J.; Anti-malarial activity of Baylis–Hillman Adducts from Substituted 2-chloronicotinaldehydes. **Bioorganic e Medical Chemistry Letters**, 2005.

NAKARUMA, Y.; KAWAKAMI, M.; YOSHIHIRO, M. A.; MYOSHI, N.; OHIGASHI, H.; KAWAI, K.; OSAKA, T.; UCHIDA, K.; Involvement of mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 10, p. 8492-8499. 2002.

OKADA, H.; MAK, T.W.; Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer.**;4:592-603. 2004.

OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Mol Cell Biochem.**, n. 351, p. 41 - 58, 2011.

PACHECO, J.M.; TRAULSEN, A.; DINGLI, D.. The allometry of chronic myeloid leukemia. **J. Theor. Biol.** 2009.

PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, v.1, n.18, p.3-22, 2003.

PEJOVIC, T.; SCHWARTZ, P. E. Leukemias. **Clin Obstet Gynecol**, v.45, n.3, p.866-78, 2002.

PELLEGRINE, M. P. PINTO, R.C.V.; CASTILHO, L.R.; Mecanismo de crescimento e morte e células animais cultivadas invitro. In: MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. (Ed.). **Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia gênica**. 1 ed. São Paulo: [s.n.], P. 138-169. 2008.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integr Biol (Camb)**, v. 3, n. 4, p. 279- 296, 2011.

QUINTAS-CARDAMA, A.; CORTES, J.E.; Chronic myeloid leukemia: Diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**.v. 81, n.3, p 973-988, 2006.

RAMANATHAN, M.; Flow cytometry application in pharmacodynamics and drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 14, n.9, p. 1106-1114, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.N.; e RITTER, J.M.; **Farmacologia**, 6º edição, Editora Elsevier, 2007.

REDDY L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 99, p. 1– 13, 2003.

RENZI, D.; VALTONILA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, p. 89 - 96; 1993.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc.**, v. 1, n. 3, p. 1458 - 1461, 2006.

RICCI, M. S.; ZONG, W. X.; Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**.;11:342-57. 2006.

ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I.; **Toxicology in vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

SAELEN, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEEL P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**. v. 23, p. 2861-2874, 2004.

SANDES, J. M.; BORGES, A. R.; JUNIOR, C. G. L.; SILVA, F. P. L.; CARVALHO, G. A. U.; ROCHA, G. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; 3-

Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propane nitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Chem.** 38, 190-195, 2010.

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D.; STRATTON, M. R.; COOPER, C. S.; A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 10, n. 1, p. 59 - 64, 2010.

SARKARIA, J. N.; KITANGE, G. J.; JAMES, C. D.; PLUMMER, R.; CALVERT, H.; WELLER, M.; WICK, W.; Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. **Clin. Cancer Res.**; 14(10):2900-8. 2008.

SASSIOTO, M.C.P.; FILHO, N.C.; FACCO, G.G.; SODRÉ, S.T.; NEVES, N. S.; PURISCO, U.; FARIAS, A.G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos, **Acta Cir. Bras.** V. 19, p. 637-641, 2004.

SCHRÖTEROVÁ, L.; KRÁLOVÁ, V.; VORÁCOVÁ, A.; HAŠKOVÁ, P.; RUDOLF, E.; CERVINKA, M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicol In Vitro**, n. 23, p. 1406 - 1411, 2009.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; RÁMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLÉS, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly (ε-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 5603 - 5611, 2004.

SILVA, F. P. L.; ASSIS, P. A. C.; JUNIOR, C. G. L.; ANDRADE, N. G.; CUNHA, S. M. D.; OLIVEIRA, M. R.; VACONCELLOS, M. L. A. A.; Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts. **Eur. J. of Med. Chem.** 2011.

SILVEIRA, A. L. Toxicidade pré-clínica dos análogos das riparinas I, III e III utilizando modelos *in vitro*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2007.

SIRAKI, A. G.; POURAHMAD, J.; CHAN, T. S.; KHAN, S.; O'BRIEN, P. J.; Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 32, n. 1, p. 2 - 10, 2002.

SLEE, E. A. et al.; Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J. Cell. Biol.**, n. 144, p. 281-292, 1999.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death Differ**, n. 6, p. 1067-1074, 1999.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. K.; WEEKS, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 20 - 29, 2004.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Geneva: WHO Press, 2008.

SZCZEPANSKI, T.; Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? **Leukemia**. **21**: 622-626. 2007.

TAUB, J. W.; High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 99, p. 2992-2996, 2002.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 3, p. 231 - 241, 2008.

THOMAS, G.; Química Mecinal: uma introdução. Guanabara Koogan S.A.; 2003.

THÖRN, M.; FINNSTROM, N.; LUNDGREN, S.; RANE, A.; LOOF, L.; Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. **Br J Clin Pharmacol** 60:54-60. 2005.

THORNTON, D. E.; JONES, K. H.; JIANG, Z.; ZHANG, H.; LIU, G.; CORNWELL, D. G. Antioxidant and cytotoxic tocopheryl quinones in normal and cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 6, p. 963 - 976, 1995.

VASCONCELLOS, M.L.A.A.; SILVA, T.M.S.; CAMARA, A.C.; MARTINS, R.M.; LACERDA, K.M.; LOPES, H.M.; PEREIRA, V.L.P.; SOUZA, R.O.M.A.; CRESPO, L.T.C.; Baylis–Hillman Adducts with Molluscicidal Activity Against *Biomphalaria glabrata*. **Pest Management Science**, 2006.

WATKINS, P. B.; The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. **Adv Drug Deliv Rev** 27:161-170. 1997.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A.; Glossary of terms used in medicinal chemistry, **Pure e Appl. Chem.**, 70: 1129, 1998.

WEAVER, B. A.; CLEVELAND, D. W.; Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell** ;8:7-12. 2005.

WHITEHEAD, A.; KUIVILA, K. M.; ORLANDO, J. L.; KOTELEVTSSEV, S.; ANDERSON, S. L.; Genotoxicity in native fish associated with agricultural run off events. *Environ Toxicol Chem*, 23: 2868-2877, 2004.

WIDLAK, P.; GARRARD, W. T. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. **Cell Mol Life Sci.**, v. 66, n. 2, p. 263 - 274, 2009.

WIEMELS, J. L.; et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **Lancet**, v. 354, p. 1499-1503, 1999.

WIEMELS, J. L et al. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. **Blood**, v. 94, p. 1057-1062, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report, International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.

WU, C. P.; CALCAGNO, A. M.; AMBUDKAR, S. V. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. **Curr Mol Pharmacol.**, v. 1, n. 2, p. 93 - 105, 2008.

YANG, W. L.; ADDONA, T.; NAIR, D. G.; QI, L.; RAVIKUMAR, T. S.; Apoptosis induced by cryo-injury in human colorectal cancer cell is associated with mitochondrial dysfunction. **Int. J. Cancer**, v. 103, n. 3, p. 360-369, 2003.

ZAMAI, L.; CANONICO, B.; LUCHETTI, F.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GUIDOTTI, L.; CAPPELLINE, A.; CUTRONEO, G.; VITALE, M.; PAPA, S.; Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells. **Cytometry**, v. 44, n. 1, p. 57-64, 2001.

ZHOU, J.; GOLDWASSER, M. A.; LI, A.; DAHLBERG, S. E.; NEUBERG, D.; WANG, H.; Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. **Blood** ; **110**: 1607-1611. 2007.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P.; Morphological features of cell death. **News Physiol Sci.** 19:124-28. 2004.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B.; Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**;20:1-15. 2006.

ZUCCO, F.; ANGELIS, I.D.; TESTAI, E.; STAMMATI, A.; Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro.** 18: 153-163, 2004.